

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



**Expresión de Aurora Quinasa A, Aurora
Quinasa B y Survivina en Relación con el
Ciclo Celular de las Queratosis Actínicas y
de los Carcinomas Epidermoides de la Piel**

TESIS DOCTORAL

Luis Ágreda Ulloa

Madrid, 2015

AGRADECIMIENTOS:

al **Prof. Dr. David Hardisson**, por su apoyo, asesoría y profundo conocimiento científico de las moléculas exploradas en este estudio.

al **Prof. Dr. Javier Regadera**, por su dedicación e inestimable orientación académica, y por su amistad sincera que permanece desde hace tres décadas.

al **Dr. Enrique Niembro de Rasche**, del Hospital de Madrid, experto patólogo y por su generosa cesión de de las biopsias de carcinomas cutáneos evaluados en este estudio.

a la **Dra. María Beato**, Dermatóloga y Patóloga, por su adecuada selección de las biopsias de queratosis actínicas, las cuales han permitido obtener resultados de singular importancia.

al **Dr. Luis Alberto Condezo- Hoyos**, por su asesoramiento en los métodos estadísticos a las Técnicas Superiores de Anatomía Patológica, **Dña. Carmen Sánchez Palomo** (Facultad de Medicina de la UAM) y **Dña. Raquel Marcos Hernández** (Hospital La Paz), por la calidad de los métodos inmunohistoquímicos.

Y mi reconocimiento a las instituciones que me permitieron formarme y desarrollar mi especialidad de Cirugía Plástica: La **Facultad de Medicina** de la UAM, el **Hospital Universitario La Paz** y el **Hospital Universitario de Madrid**.

DEDICATORIA:

a **Luly**, mi mujer, por su generoso amor y su gran corazón, a quien debo el saber que la verdad está en uno mismo, se realiza pensando en los demás y se fortalece rodeado de la familia.

a mis hijos: **Mónica, Patricia, Lulita, Pablo, Eduardo e Isa**, por su amor y cariño.

a mis nietos: **David y Luz**, por ser esperanza en mi vida.

a mis padres **Pablo y Boni** que siempre están presentes en mis recuerdos.

INTRODUCCIÓN	1
CÁNCERES CUTÁNEOS NO MELANOCÍTICOS	2
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA CARCINOGENESIS Y DE LA PROGRESIÓN TUMORAL	9
MOLECULAS REGULADORAS DE CICLO CELULAR FRECUENTEMENTE EXPLORADAS EN LA PATOLOGÍA TUMORAL HUMANA	11
<i>Antígeno de Proliferación Celular Ki 67 (MIB-1)</i>	11
<i>Significado de la Expresión de p53 en Tumores</i>	13
<i>Estudio Inmunohistoquímico de Marcadores de Ciclo Celular en Neoplasias Humanas</i>	16
BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LOS CARCINOMAS CUTÁNEOS	20
QUERATOSIS ACTÍNICAS	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	30
MATERIAL	31
MÉTODOS	31
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	31
Fijación de las Piezas	31
Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas	31
<i>Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica</i>	32
1. Método Inmunohistoquímico de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)	33
2. Método Inmunohistoquímico de Envision	34
<i>Cuantificación</i>	35
<i>Técnicas Fotográficas</i>	36
RESULTADOS	37
DATOS CLÍNICOS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMOIDES CUTÁNEOS	38
<i>Figura 1. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Ki 67</i>	41
<i>Figura 2. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - Ki 67</i>	42
<i>Figura 3. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - P53</i>	43
<i>Figura 4. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - P53</i>	44
<i>Figura 5. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Aurora A</i>	45
<i>Figura 6. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente diferenciado - Aurora A</i>	46

<i>Figura 7. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Aurora B</i>	47
<i>Figura 8. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente diferenciado - Aurora B</i>	48
<i>Figura 9. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Survivina</i>	49
<i>Figura 10. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - Survivina</i>	50
<i>Figura 11. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Fosfosurvivina</i>	51
<i>Figura 12. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - Fosfosurvivina</i>	52
DATOS CLÍNICOS DE LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS	53
<i>Figura 13. Queratosis Actínica - Ki67</i>	55
<i>Figura 14. Queratosis Actínica - Ki67</i>	56
<i>Figura 15. Queratosis Actínica - p53</i>	57
<i>Figura 16. Queratosis Actínica - Aurora A</i>	58
<i>Figura 17. Queratosis Actínica - Aurora B</i>	59
<i>Figura 18. Queratosis Actínica - Survivina</i>	60
<i>Figura 19. Queratosis Actínica - Fosfosurvivina</i>	61
CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS	62
SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS	63
CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LA PIEL NORMAL	64
SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LA PIEL NORMAL	65
SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS	66
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	80
RESUMEN	83
SUMMARY	86
REFERENCIAS	89

INTRODUCCIÓN

CÁNCERES CUTÁNEOS NO MELANOCÍTICOS

Los cánceres cutáneos de estirpe no melanocítica más importantes son los carcinomas de células basales, desde ahora epiteliomas basocelulares (EB) y los carcinomas de células escamosas, también denominados carcinomas epidermoides (CE). Ambos tienen muchas similitudes, pero tienen diferencias etiológicas importantes. Los cánceres cutáneos suponen una carga económica importante en los sistemas nacionales de salud y tienen ellos mismos una morbilidad significativa dentro de los cánceres cutáneos que asientan en las zonas expuestas al sol, tales como la cara y el cuello.^{60,108} Los cánceres cutáneos se producen por mecanismos complejos de forma secuencial, que no difieren en general, de los mecanismos de producción de otros tipos de tumores.

El EB es el cáncer cutáneo con mayor incidencia en el mundo¹¹³ y tiene una tasa de mortalidad excepcionalmente baja.^{79,105,169} Se origina a partir de las células no queratinizadas de la capa basal de la epidermis.^{89,124,148} Se presenta más frecuentemente en cabeza, cuello y zonas expuestas a los rayos ultravioletas. Ocasionalmente puede presentarse en otras zonas no expuestas al sol, tales como axilas, tórax y regiones genitales. Muy raramente producen metástasis.^{6,191}

El CE se origina en los queratinocitos de la epidermis de las zonas expuestas al sol. Aunque también puede originarse a partir de lesiones previas, tales como queratosis, procesos cicatriciales (quemaduras, úlceras crónicas), agentes químicos, virus del papiloma humano,^{49,53,63} radiaciones ionizantes y tratamientos con inmunosupresores.¹⁹¹ Los CE son más frecuentes en la población masculina que en la femenina y en las mujeres aparece en edades más tempranas.^{42,123}

El CE es un cáncer cutáneo que se produce por la proliferación de células del estrato basal y suprabasal, dando origen a un epitelio poliestratificado.^{1,10,118,168} Los CE generalmente son tumores bien diferenciados, siendo frecuente la formación de masas tumorales de células escamosas con abundante presencia de masas de queratina, junto con queratinocitos que forman los típicos globos córneos, pero algunos casos de CE debutan como tumores mucho más agresivos, con mayor capacidad infiltrativa, mostrando células escamosas pobremente diferenciadas, hecho que ocurre mucho mas habitualmente en

tumores recidivantes.^{92,94,95} Algunos CE son muy indiferenciados, lo que dificulta el diagnóstico histopatológico, tal como ocurre en los CE con predominio de células fusiformes, en los carcinosarcomas, en los carcinomas de anexos cutáneos, incluidos los carcinomas adenoescamosos y los carcinomas mucoepidermoides pobremente diferenciados, y en los CE de células claras,^{134,152,156,157} pero estos casos son poco frecuentes. En estos casos, la expresión de determinados marcadores inmunohistoquímicos de proliferación y de marcaje del fenotipo celular es diferente.^{80,146,147,159,161}

De otra parte, estudios epidemiológicos han demostrado que el número de casos de CE está aumentando desde las tres o cuatro últimas décadas de forma progresiva, aunque no tan rápido como los casos de EB. El porcentaje de EB es el 80% de los carcinomas cutáneos no melanomas, mientras que los CE son un 20% de los mismos, pero en los pacientes trasplantados esta proporción se invierte hasta 1:1.8 y 1:15.⁵⁴

En España se estima que habrá en los próximos años un porcentaje de 70 por 100.000 habitantes en el caso de las mujeres y de 100 por 100.000 habitantes para los varones. El tratamiento de los tumores cutáneos es quirúrgico, y consiste en la extirpación de los tejidos afectados, además existe un grupo de alto riesgo que muestra mayor tendencia a la recidiva local, a la diseminación linfática y en ocasiones a la invasión de órganos distantes.^{57,58,171}

La etiología no es bien conocida, existen una serie de factores predisponentes: 1) la exposición al sol durante la infancia y adolescencia, es más acumulativa en el caso de los CE^{41,42} 2) las radiaciones ionizantes en el tratamiento de cánceres en la infancia, y 3) la terapia inmunosupresora después de trasplantes de órganos.

Los CE pueden aparecer en piel sana, aunque se asocia con mucha frecuencia con la queratosis actínica, llegando incluso algunos autores a considerar que es una misma enfermedad con diferentes estadios evolutivos, de modo que se produciría una transformación neoplásica de los queratinocitos epidérmicos, estimulados por las radiaciones ultravioletas,⁴¹ también enfermedades que cursan con alteraciones inmunológicas de la piel, pacientes inmunosuprimidos¹⁸⁵ y grandes quemados frecuentemente desarrollan cánceres cutáneos.

Los CE y EB pueden asentar sobre otras patologías preexistentes, aunque menos frecuentemente, tales como nevus, papilomas víricos, queratosis seborreicas, psoriasis (sobre todo las tratadas con Psoralen plus, UVA), lupus eritematoso y cicatrices postquemaduras.^{5,42,71} Clínicamente los CE son de crecimiento lento, se presentan como una pápula eritematosa con depresión central en forma de cráter; también pueden presentarse como cuernos cutáneos queratósicos, así llamados por su forma protruyente.^{5,71}

En la histología de los CE se suelen distinguir dos formas: el CE in situ y el CE infiltrante. En el primero, la proliferación neoplásica está limitada a la epidermis sin sobrepasar la capa basal. En los tumores infiltrantes, las células neoplásicas se disponen desordenadamente y se extienden al dermis en forma de cordones y nidos celulares, siendo frecuentes las mitosis atípicas.

Los CE se pueden clasificar según la proporción de células indiferenciadas en grados: CE bien diferenciados, CE medianamente diferenciados y CE poco diferenciados. Más del 80% son CE bien diferenciados y producen queratina en forma de “perlas córneas”, en estos casos las células malignas infiltran el dermis, bien empujando al tejido conjuntivo, formando masas sólidas bien delimitadas, con una interfase lisa bien delimitada por bandas de tejido conjuntivo denso a modo de pseudocápsula, lo que determina el patrón característico del carcinoma de tipo verrucoso, el cual tiene un excelente pronóstico. Pero otros CE bien diferenciados, crecen en el dermis con un carácter infiltrativo muy irregular, originando una respuesta inflamatoria moderada o intensa del dermis, así como una reacción fibrosa desmoplásica; además, en estos casos tan infiltrantes, la cohesión de las células neoplásicas es menor, existiendo áreas en las que predomina el patrón de infiltración cordonal e incluso la infiltración de células malignas aisladas; por lo que en estas áreas no es infrecuente visualizar células malignas penetrando en los vasos linfáticos. Los CE moderadamente diferenciados y sobre todo los pobremente diferenciados, aunque aisladamente se pueden ver perlas córneas, predomina la proliferación de queratinocitos de escaso citoplasma y con pobre diferenciación de tonofilamentos, mostrando núcleos pleomórficos y abundantes mitosis atípicas. En estos casos pobremente diferenciados, el carácter infiltrativo es mucho mayor e irregular y además es muy evidente el alto índice mitótico, siendo la respuesta

inflamatoria y la fibrosis desmoplásica de los bordes de la lesión. Además de los CE y EB, en la piel existen numerosos tipos de tumores benignos y malignos, cuya clasificación actual viene reflejada en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la OMS 2005 de los tumores epiteliales de glándulas salivares.

Neoplasias Epiteliales Malignas	Tumores Epiteliales Benignos	Tumores de Tejidos Blandos
Carcinoma de células acinares	Adenoma pleomórfico	Hemangioma
Carcinoma mucoepidermoide	Mioepitelioma	Tumores hematolinfoides
Carcinoma adenoideo quístico	Adenoma de células basales	
Adenocarcinoma polimorfo de bajo grado		
Carcinoma epitelial-mioepitelial	Tumor de Warthin	Linfoma difuso de células grandes tipo B
Carcinoma de células claras sin otra especificación	Oncocitoma	
Adenocarcinoma de células basales	Adenoma canalicular	Linfoma extranodal de la zona marginal de células B
Carcinoma sebáceo	Adenoma sebáceo	
Linfadenocarcinoma sebáceo	Linfadenoma	
Cistadenocarcinoma	Papiloma ductal sebáceo/no-sebáceo	Tumores secundarios
Cistadenocarcinoma cribiforme de bajo grado		
Adenocarcinoma mucinoso	Papiloma ductal invertido	
Carcinoma oncocítico		
Carcinoma de ductos salivales	Papiloma intraductal	
Adenocarcinoma sin otra especificación	Sialadenoma papilífero	
Carcinoma mioepitelial	Cistadenoma	
Carcinoma ex – adenoma pleomórfico		
Carcinoma		
Adenoma pleomórfico metastatizante		
Carcinoma de células escamosas		
Carcinoma de células pequeñas		
Carcinoma de células grandes		
Carcinoma linfoepitelial		
Sialoblastoma		

En relación con **el tamaño de la lesión**, se ha visto que aquellos tumores que tienen más de dos centímetros de diámetro, tienen el doble de probabilidad de recidivar. En cuanto a la profundidad, en el estudio de Brantsch *et al.*, 2008,²⁹ se concluyó que los tumores que tenían menos de 2 mm de profundidad tenían un riesgo de metástasis nulo, que los que tenían entre 2,1 y 6 mm se elevaba al 4% y si tenían más de 6 mm de profundidad hasta el 16% tenían metástasis.

La **invasión perineural** se define como la situación en que las células del tumor se disponen alrededor de una vaina nerviosa y se diseminan a través del nervio. La invasión perineural puede ser clínica o histológica y se asocia a una mayor tasa de recidivas, incluso a la disminución de la supervivencia. Todos los estudios coinciden en que la invasión perineural es un factor de mal pronóstico.⁵⁴

En relación del **tipo histológico**, algunos autores consideran al CE desmoplásico de mayor agresividad, también al adenoescamoso y al CE “de novo” que es el que aparece sin lesión precursora previa, tipo queratosis actínica, sino sobre una cicatriz o inflamación crónica. Se dividen los CE en la práctica habitual, en bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente o no diferenciados. Estos últimos son los que presentan un comportamiento más agresivo.

Además desde el punto de vista clínico, los CE se clasifican de Bajo riesgo o de Alto riesgo, según la capacidad de crecimiento invasivo y posibilidad de recidivas, así como de la posibilidad de metastatizar. Según la clasificación NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), se tiene en cuenta los siguientes datos: la localización (alto riesgo en las zonas expuestas al sol, bajo riesgo en las no expuestas), en el tamaño de la lesión (alto riesgo si es de más de 20 mm de diámetro), en el tiempo de evolución (alto riesgo si es de evolución rápida).¹⁵

Para determinar o predecir el comportamiento clínico de un cáncer y poder establecer criterios de tratamiento, los cánceres se clasifican con esquemas de gradación citológica e histológica o mediante protocolos de estadios clínicos que describen la extensión de la diseminación. Surge así la clasificación TNM de los tumores, la cual está basada en el tamaño

del tumor, extensión del crecimiento local si se hace dentro o fuera del órgano, la existencia de la afectación o no de ganglios linfáticos y la presencia de metástasis a distancia. Por ejemplo un carcinoma cutáneo **T3 N2 MØ**, quiere decir que es un gran tumor primario (**T3**), que afecta a ganglios linfáticos axilares de forma moderada (**N2**) pero no se detecta en zonas distantes (**MØ**).

Tabla 2. Carcinoma Epidermoide Cutáneo de Alto Riesgo. Se definen como CE de alto riesgo aquellos que tienen un riesgo de recidiva y/o metástasis ganglionares o a distancia mayor del 5%.

Clasificación del Carcinoma Epidermoide Cutáneo		
Clasificación TNM ²	Alto Riesgo ¹	a: tamaño mayor de 2 cm de diámetro
		b: profundidad de afectación histológica superior a 2 mm (Clark >IV)
		c: localización pabellón auricular y mucosa labial
		d: grado de diferenciación histológica (Pobrementemente o No diferenciado)
	Tamaño tumoral (T)	TX: no se puede localizar el tumor primario
		T0: No hay evidencia del tumor primario
		Tis: carcinoma <i>in situ</i>
		T1: carcinoma menor de 2 cm de diámetro
		T2: carcinoma mayor de 2 cm de diámetro
		T3: invasión tumoral de maxila, órbita, hueso temporal
		T4: invasión perineural a base craneal
	Afectación de ganglios linfáticos	Nx: no se pueden valorar ganglios linfáticos
		N0: no hay metástasis en ganglios linfáticos regionales
		N1: metástasis en un ganglio linfático ipsilateral de menos de 3 cm
		N2: metástasis en un ganglio linfático ipsilateral de más de 3 cm
		N3: metástasis en un ganglio linfático ipsilateral de más de 6 cm
	MD	M0: no hay metástasis a distancia
		M1: sí hay metástasis a distancia

¹Si un tumor cumple dos o más criterios de éstos, pasaría a tener un riesgo mayor; ²clasificación TNM según la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*); MD: Metástasis a distancia

Los pacientes con tratamientos inmunosupresores (los que han recibido un trasplante de órgano sólido principalmente), tienen más tendencia a tener CE y a su vez de comportamientos más agresivos. Las zonas de alto riesgo y de peor evolución clínica, según la AJCC, se han definido como el labio y el pabellón auricular; en estas zonas las metástasis se incrementan del 5% al 15% y a su vez empeoran su estadio.⁵⁴

De todos estos factores, todavía no hay acuerdo de cuántos deben cumplirse para considerar a un CE como de alto riesgo; para algunos autores con tener uno sería suficiente, mientras que otros hablan de necesitar dos o más factores. Como los CE más frecuentes son los de cabeza y cuello, las metástasis regionales se encontrarán en parótida y/o ganglios cervicales.

El tratamiento de los CE consiste en la extirpación por exéresis del tejido tumoral respetando, dentro de lo posible, el máximo de tejidos sanos, con márgenes histológicos libres de neoplasia. Estos márgenes varían según el tamaño del tumor; aquéllos que tengan menos de 2 cm con un margen de 4 mm es suficiente y en los que tengan más de 2 cm con 6 mm de margen en el 95% de los casos se resuelve satisfactoriamente.⁶²

El tratamiento por frío -la criocirugía- y el curetaje estarían indicados en los tumores de bajo riesgo de metástasis, aunque en nuestros casos contemplamos solamente la extirpación quirúrgica por escisión del tumor con márgenes laterales y de profundidad. La microcirugía de Mohs, cirugía de extirpaciones secuenciales asistidas por estudio histológico en el momento, podría ser una técnica para los casos de tumores recidivantes.

La cirugía micrográfica de Mohs es una técnica que, sin embargo, es controvertida. Para algunos autores es una buena técnica porque se extirpa todo el tejido tumoral con el máximo ahorro de tejidos sanos y para otros no tiene grandes ventajas, con la dificultad añadida de la complejidad técnica y de medios materiales necesarios.

La biopsia del ganglio centinela no tiene consenso de su eficacia clínica. Para algunos autores aquellos pacientes con CE pobremente diferenciado, mayor de 4 cm con recidiva, que asienten en labio o pabellón auricular y con tratamientos inmunosupresores, deberían ser candidatos a la biopsia del ganglio centinela, pero otros hablan en estos casos de realizar

linfadenectomías profilácticas (que consiste en extirpar las adenopatías cervicales ipsilaterales); pero esta técnica es una intervención quirúrgica agresiva y por lo tanto está muy controvertida, si consideramos que los CE y los EB son patologías que asientan en pacientes de edades avanzadas y con factores de co-morbilidad añadidos.⁸⁷ Si bien en numerosos casos con tumores malignos, los estudios citológicos dan resultados muy satisfactorios, debido a su rapidez y simplicidad en la toma de muestras,⁶⁹ el estudio de citología por punción con aguja fina PAAF, tan utilizada en de las adenomegalias, pudiera ser útil en el diagnóstico de metástasis ganglionares regionales en los CE de piel de personas con riesgo quirúrgico.

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LA CARCINOGENÉISIS Y DE LA PROGESIÓN TUMORAL

Está bien establecido que las neoplasias (palabra que proviene del griego “neo”: nuevo y “plasma”: materia formada) son el resultado de un crecimiento autónomo de las células que se escapa a los mecanismos de control moleculares de la célula normal, tanto en el caso de los tumores benignos como de los malignos, los cuales tienen potencialmente la capacidad de infiltrar tejidos vecinos y desencadenar metástasis a distancia.^{40,158} Los tumores pueden expresar grados variables de diferenciación, desde las estructuras de relativa madurez que imitan a los tejidos normales, hasta una acumulación de células tan primitivas o indiferenciadas que las células de origen no puedan identificarse.

El comportamiento biológico de algunos tipos de cánceres no refleja obligatoriamente una correlación con su aspecto histológico, de modo que, cánceres que muestran características histológicas de malignidad es posible que no metastaticen, y, por ende, no pongan en riesgo la vida del huésped.³¹ Ejemplo típico es el EB de piel, que puede invadir estructuras subyacentes de forma localizada sin metastatizar.^{50,110,116}

Histológicamente los tumores malignos pueden mostrar anaplasia o atipia celular y pleomorfismo, núcleos grandes e hipercromáticos, células gigantes multinucleadas; gran actividad mitótica; patrones de crecimiento desorganizados; invasión de tejidos de vecindad y de los vasos sanguíneos y linfáticos, sobre todo aquellos tumores que tienen aumento de la angiogénesis.^{64,119,120} En las metástasis, los tumores suelen ser muy desdiferenciados, por

lo que en ocasiones es difícil determinar cuál es el órgano inicial en el que se ha originado el tumor primario.¹⁹²

Con el fin de establecer un diagnóstico correcto de los diferentes tipos de tumores primarios, se han evaluado numerosos marcadores tumorales que identifican moléculas secretadas por las células tumorales, lo cual es muy útil para identificar la célula de origen de un tumor metastásico o de un tumor primario con escasa diferenciación, sobre todo para solventar la dificultad de establecer el diagnóstico diferencial entre un tumor desdiferenciado de origen epitelial de otro de origen mesenquimal;²³ además los tumores epiteliales malignos pueden sufrir una transformación epitelio-mesénquimal, lo cual depende de complejos mecanismos de regulación de las células neoplásicas y del estroma peritumoral.¹¹⁷ En definitiva el alto valor de los marcadores inmunohistoquímicos y moleculares en los tumores malignos, no solo tiene un máximo interés en establecer el diagnóstico correcto de cada tipo de tumor, sino también en conocer los mecanismos biológicos y moleculares implicados en la progresión del tumor; pero además estos marcadores tienen relevancia terapéutica para el paciente, dado que pueden ser importantes para la toma de decisiones terapéuticas, dado que el tratamiento inicial de los carcinomas suele ser el de extirpación quirúrgica, mientras que el de los linfomas y sarcomas muchas veces exige aplicar inicialmente tratamientos de radioterapia y de quimioterapia.

En el desarrollo de una neoplasia maligna están implicados numerosos mecanismos de carcinogénesis, resultado de numerosas alteraciones que se producen en el ADN.¹⁴ Las neoplasias se originan a partir de mutaciones de los genes que regulan el crecimiento celular, la muerte o la reparación del ADN.^{26,78,114,158} En estas alteraciones están implicados los oncogenes, los cuales por variaciones de la secuencia de los nucleótidos adquieren capacidades tumorales y los protooncogenes que son secuencias génicas que codifican las proteínas que controlan el crecimiento y la diferenciación celulares.^{26,129,150,190} Los oncogenes participan en la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares; de otra parte, en la diseminación y metástasis de las células tumorales sintetizan y/o codifican oncoproteínas. Los factores de crecimiento, estimulan la proliferación de las células normales y se cree que la sobreexpresión de estos factores de crecimiento determinan

mutaciones en las neoplasias malignas.⁸ Se sabe que en la proliferación celular se producen sucesivamente los siguientes procesos: 1) unión de un factor de crecimiento a su receptor específico, que está localizado en la membrana celular, 2) activación del receptor del factor de crecimiento que activa a varias proteínas transductoras de señales, las cuales están en la cara interna de la membrana citoplasmática, 3) circulación de esta señal por el citosol, y posterior penetración de esta molécula de señalización en el núcleo, donde se inicia la transcripción del ADN, y 4) iniciación de las diferentes fases del ciclo celular que terminarán en la división celular.¹³⁷ En el ciclo celular tenemos que considerar las siguientes fases: G-0: estado quiescente de la célula, G-1: crecimiento y síntesis de proteínas, S: replicación del ADN, G-2: preparación para la división, y M: división celular.

MOLÉCULAS REGULADORAS DE CICLO CELULAR FRECUENTEMENTE EXPLORADAS EN LA PATOLOGÍA TUMORAL HUMANA

Está claramente demostrado que la carcinogénesis es un proceso secuencial que conlleva la alteración de los sistemas que regulan las funciones celulares. Se ha demostrado in vivo e in vitro, que mecanismos como la activación de protooncogenes, la pérdida de antioncogenes y la sobreproducción de factores de crecimiento (regulados por receptores específicos de membrana o de señalización celular), están relacionados con la aparición de una neoplasia.¹⁹⁵ En la proliferación celular, la secuencia de acontecimientos viene determinada por factores de crecimiento que se unen a su receptor específico de la membrana celular, y se produce la activación transitoria del receptor que, a su vez, activa a las proteínas transductoras de señales desde la membrana plasmática hasta el núcleo, en donde esta información determina la activación de factores reguladores que inducirán el inicio del ciclo celular, esto es, la división celular.^{12,193}

Antígeno de Proliferación Celular Ki 67 (MIB-1)

La actividad proliferativa está aumentada en los tumores malignos, lo cual puede ser valorado mediante la detección inmunohistoquímicamente de Ki67.⁶⁵ En los tumores humanos se ha encontrado una relación directa entre el incremento de la expresión de Ki67 y la agresividad y peor pronóstico del tumor; surgiendo la cuantificación en las biopsias del denominado índice de proliferación celular Ki67, expresado como el número de núcleos de

células tumorales que expresan el antígeno Mib-1, por el total de núcleos en una determinada superficie tumoral. El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear que se expresa en las fases activas del ciclo celular: G2, S y M, de todas las células que se encuentran en proliferación, no siendo detectable en la fase G0 ni en la primera etapa de G1, pero su expresión en esta fase inicial es bastante baja y variable, de hecho es indetectable en la transición temprana de G0 a G1 y en la primera fase de G1T y G1A; habiéndose sugerido que esta peculiaridad en la expresión del antígeno Ki 67 se debe a que la primera transición de G0 a G1 es una secuencia de iniciación de proliferación y no pertenece a ninguna fase del ciclo celular. Sin embargo, la expresión nuclear de Ki67 siempre es positiva en la fase S (de replicación del ADN).¹⁵⁵

Con el fin de establecer la relación del índice de proliferación celular y el grado de malignidad tumoral, numerosos trabajos se han centrado en establecer el punto de corte a utilizar para separar los tumores malignos como de bajo o alto índice proliferativo, aunque los datos acerca del punto de corte son controvertidos, no solo entre tumores de tipo histológico diferente, si no entre estudios publicados para cada tipo de tumor; con todo, la determinación del índice proliferativo se ha reportado previamente como un factor pronóstico importante en la patología oncológica.^{9,22,35,45,187} En estudios de cáncer de mama, hay autores que proponen establecer el punto de corte en el 10% de células positivas,³⁸ mientras que otros proponen como valor discriminante el 20% de células Ki67 positivas.⁹³ En el cáncer de mama, recientemente gracias a la cuantificación del Ki67, junto con otros marcadores moleculares, se ha podido establecer dos grandes grupos de tumores con pronóstico diferente: el cáncer de mama de patrón luminal A y el de patrón luminal B, recomendándose como el punto de corte el 14% de células Ki67 positivas, por encima del cual deberá ser considerado un patrón luminal B.³⁵ En definitiva, mientras más elevado sea el índice Ki-67, mayor será la fracción de células tumorales en proliferación y la agresividad del tumor, lo cual se relaciona con un pronóstico más sombrío de las pacientes con cáncer de mama.^{22,35,45}

Significado de la Expresión de p53 en Tumores

Recientemente en los mecanismos de carcinogénesis y progresión tumoral tiene especial relevancia el estudio de los genes supresores tumorales, los cuales están implicados en diversos procesos de la división celular, la regulación de la expresión génica, el control del ciclo celular, la programación de la muerte celular y la estabilidad del genoma. La pérdida de actividad de estos genes provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular, por lo que se produce una proliferación incontrolada de las células neoplásicas. En relación con los genes supresores tumorales, es importante considerar al gen del retinoblastoma (gen Rb), el primer gen supresor de tumores conocido, el cual actúa como freno al progreso de la célula desde la fase G-1 a la fase S del ciclo celular.

Así mismo, es de singular importancia el estudio del gen supresor tumoral p53, el cual ha sido considerado el “guardián del genoma”. El gen p53 está situado en el brazo corto del cromosoma 17 y está compuesto por 11 exones. Su producto es una fosfoproteína nuclear de 53 Kd formada por 393 aminoácidos (proteína p53).² Cuando aparecen mutaciones en p53, se produce una síntesis anormal de la proteína que va a acumularse en el núcleo y pierde su capacidad supresora del crecimiento celular, por lo que se produce una detención del ciclo celular en G-1, y además tiene la capacidad en algunos casos de reparar el daño del ADN. Pero si el daño del ADN es muy extenso y no puede ser reparado, la proteína p53 induce el inicio de la muerte celular por apoptosis,^{2,83,111} modificando la regulación de bcl-2 o afectando al potencial de la membrana mitocondrial.¹¹¹

La pérdida de la función normal de la molécula p53 es un evento crítico en el desarrollo y evolución tumoral y ocurre a través de una sucesión de eventos, típicamente mutaciones seguidas de pérdida de heterozigosidad. La proteína p53 tiene una vida media muy corta, por lo que en condiciones normales no se puede detectar su presencia, pero las mutaciones del gen p53 aumentan su vida media, y por tanto su acumulación en la célula, lo cual permite su detección mediante técnicas de inmunohistoquímica.² En tumores humanos esta pérdida de la función de p53 supone una ventaja para el crecimiento y la selección de clones tumorales. La expresión de p53 en los diferentes tipos de tumores malignos es muy variable, habiéndose publicado datos muy contradictorios; por ejemplo, en los carcinomas

renales se ha obtenido, dependiendo de la serie estudiada, una positividad entre el 16 y el 57 % de las células tumorales^{77,127,165,178,203} y estos porcentajes varían según el subtipo celular y el grado nuclear de cada carcinoma renal,^{77,179} habiéndose sugerido como punto de corte de positividad de p53 cuando la expresión se encontró en al menos el 20% de los núcleos de células tumorales.²⁰³ En tumores menos agresivos y de evolución más lenta, como es el caso del carcinoma del cérvix uterino, la expresión de la proteína p53 es baja, aún cuando exista una alta tasa de expresión del índice de proliferación celular Ki67.¹¹ En efecto, en las neoplasias intraepiteliales del cérvix (NIC) se ha descrito una expresión progresiva de Ki67 a medida que progresaba el grado de la lesión displásica;¹³³ así mismo, el índice de proliferación Ki67 fue mayor en las NIC tipo II y tipo III y sobre todo en los carcinomas cervicales infiltrantes, además, el índice Ki67 mostró una correlación con la expresión de bcl-2 pero no con la expresión de p53.¹⁰⁹

En definitiva, el p53 interviene en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis;⁴⁷ de hecho, el p53 se ha considerado el guardián de la integridad del genoma, estableciendo la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN y previniendo la inestabilidad genómica.^{23,48,104,114,121,122} En el progresivo genotipo y fenotipo se malignizarían las neoplasias, con una evidente alteración irreversible del genoma de las células tumorales, la inestabilidad genética se correlaciona directamente con una mayor capacidad de crecimiento, invasión y anaplasia tumoral, además el número de genes alterados puede determinar la capacidad de las células tumorales para adaptarse y crear resistencias a los tratamientos de quimioterapia y de radioterapia.^{25,101,199}

El crecimiento de los tumores malignos es el resultado de varios mecanismos, entre los que destaca el equilibrio entre los mecanismos de proliferación celular y de apoptosis, esto es, una muerte celular programada. Los genes que regulan la apoptosis pueden ser dominantes o recesivos.^{72,195} Los procesos de apoptosis suelen tardar unos treinta minutos y se caracterizan por rotura del citoesqueleto y de las organelas, encogimiento celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos.⁵² El equilibrio entre división y muerte celular mantiene el número total de células de cualquier órgano; cuando se produce una interferencia en ese equilibrio, puede desembocar en el desarrollo del

cáncer. Además de la apoptosis, las células tumorales pueden sufrir un proceso de autofagia,¹⁸ la cual puede ser selectiva y no selectiva: la primera detecta y digiere constituyentes celulares específicos y la segunda secuestra y cataboliza componentes citoplasmáticos de forma aleatoria. La expresión de ciertos oncogenes como la familia del gen Ras, puede estimular la autofagia lo que conduce a la senescencia celular o la muerte; por ello se considera que la autofagia puede representar una vía alternativa de muerte celular en los tumores malignos.

La apoptosis está regulada por numerosas moléculas: la familia bcl-2, el factor de necrosis tumoral, los genes supresores de tumores, los oncogenes y la familia de las caspasas, a través de mecanismos extrínsecos, con activación de la caspasa 8 y por medio de mecanismos intrínsecos que regulan la activación de la caspasa 9. El estrés celular induce a la mitocondria a liberar factores apoptogénicos. De hecho, el citocromo C, la proteína SMAC; el conjunto de éstas forman un complejo llamado apoptosoma, pero junto a este complejo, existen unas moléculas inhibitoras de la apoptosis (NIAP, CIAP-1, CIAP-2 y la inhibidora del cromosoma X, XIAP).¹⁵⁸

Por último, en los mecanismos implicados en la biología del cáncer (y también en los procesos de senescencia celular) el estudio de los telómeros y de la actividad telomerasa son de máxima actualidad. Los telómeros, secuencias repetitivas del ADN de los extremos de los cromosomas, tienden a acortarse en cada mitosis sucesiva, lo que conduce a una inestabilidad inespecífica del ADN, que si no es reparado por el gen p53, conducirá a la apoptosis. Contrariamente, la activación de la telomerasa determina un aumento de la longitud del telómero, lo que conduce a la inmortalización celular, esto es a una proliferación celular descontrolada. Por tanto, la inestabilidad genómica es un factor importante que contribuye al desarrollo del cáncer y tiene, a su vez, componentes como la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites y la metilación aberrante del ADN.¹²⁵

En definitiva, en la transformación neoplásica se presentan las siguientes fases biológicas: 1) Fase de iniciación, empieza por el daño del ADN que se expone a factores carcinogénicos exógenos o endógenos. 2) Fase de promoción, es una expansión clonal

selectiva de células iniciantes debido a la expresión alterada de los genes, y 3) *Fase de progresión*, cuando coincidiendo los factores implicados en la iniciación y la promoción del mismo, se desarrolla el cáncer de forma gradual y se caracteriza por la acumulación de alteraciones en los genes encargados de regular la homeostasis celular.

Estudio Inmunohistoquímico de Marcadores de Ciclo Celular en Neoplasias Humanas

En los diferentes tumores malignos ha demostrado ser muy útil el valorar la posible correlación entre los marcadores de proliferación celular, fundamentalmente Ki 67, con la expresión de moléculas reguladoras del ciclo celular, incluidas la expresión de p53²⁰² y de moléculas de la familia de las Aurora quinasas,^{37,51,66-68,73,82,186} así como los datos de expresión de proteínas pro-apoptóticas (Cerb-2) y con moléculas anti-apoptóticas, fundamentalmente Survivina.

Las **Aurora quinasas** son proteínas de la familia serina-treonina quinasas, cuya estructura y función está conservada en organismos eucariotas. Tres genes de la familia de Aurora quinasas se han identificado en el hombre: Auroras A, B y C.¹⁸⁴ Las Aurora quinasas se asocian con la dinámica de los centrosomas y los microtúbulos. Se localizan en el centrosoma alrededor del material pericentriolar, en los microtúbulos y en el huso mitótico, en consonancia con su participación en la separación cromosómica y la división celular.⁹⁹ El conocimiento de la biología y funciones de las Aurora quinasas es muy relevante y, relacionadas con esta familia de proteínas, recientemente se han desarrollado dianas terapéuticas prometedoras para el tratamiento del cáncer.

La **Aurora A** está codificada por el gen STK-15, el cual se localiza en la región cromosómica (20q13), se considera un oncogén que se encuentra amplificado en diversas neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de mama, de ovario y de endometrio,^{24,119,120,129,176,201} sin embargo su posible relación con las características clínico-patológicas y la evolución de los tumores no está establecida. Se sabe que STK-15 interacciona con p53 y que, asimismo, p53 es capaz de suprimir la acción transformante de STK-1, inhibiendo su actividad quinasa,³⁶ y que el gen p53 puede jugar un papel importante en el desarrollo de aneuploidía, asociándose una sobreexpresión de STK-15 como causa de

desregulación del proceso mitótico. Una mitosis anómala daría origen a parada en G1 o apoptosis en presencia de p53 funcional. En caso contrario, la célula progresará hacia rondas sucesivas de replicación del ADN y duplicación del centrosoma, dando origen a una progenie poliploide con cuatro centrosomas. En las sucesivas mitosis, la célula formará husos multipolares, causando inestabilidad cromosómica y aneuploidía.^{30,55,126}

Sin duda, la relación entre la expresión de Aurora A y p53 es un factor importante en la carcinogénesis ya que p53 interactúa con Aurora A y suprime su actividad oncogénica.³⁶ Aurora A es clave en la vía de regulación de p53, y estudios previos demuestran que la elevada expresión de Aurora A fosforila a p53 e incrementa su degradación, facilitando de este modo la transformación oncogénica.⁹⁶ La fosforilación de p53 está asociada con la progresión regulada del ciclo, supervivencia celular y transformación. Así, la alteración de este mecanismo de regulación mutua entre Aurora A y p53 conduce a las anormalidades en puntos de control e inestabilidad de centrosomas. El efecto de la expresión de Aurora A en células en división es variable dependiendo del estado de p53 y otras moléculas afines.¹¹⁵ Si se pierde la regulación de p53 y la célula dañada es incapaz de evitar la siguiente duplicación del ADN, entra en mitosis y se produce aneuploidia y cáncer.⁵⁹

La expresión de Aurora A se ha estudiado muy bien en neoplasias de células escamosas, incluidas las neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino y en el carcinoma cervical.^{177,200} En ambos tipos de lesiones cervicales, la Aurora A mostró principalmente un patrón de tinción nuclear, pero la inmunexpresión fue negativa en el cérvix normal.¹⁷⁷ En los casos de neoplasias intraepiteliales tipo III y en los carcinomas escamosos cervicales, la expresión de Aurora A se encontró, respectivamente, en el 37 % y en el 50% de los casos, pero la tinción nuclear preferentemente fue débil o moderada.

La **Aurora B** se expresa en el núcleo, lo cual funcionalmente es relevante ya que varios estudios han identificado la histona H3 como un sustrato importante de esta proteína.^{43,140} La expresión de Aurora B ha sido menos estudiada en las neoplasias malignas, con todo su expresión es nuclear intensa en los carcinomas de ovario.¹¹⁹

La **Survivina** es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis que se expresa normalmente en las células durante el desarrollo embrionario y fetal. La Survivina es esencial para la homeostasis tisular y estudios experimentales de cáncer de mama han sugerido un importante papel de la regulación de la Survivina para el mantenimiento de la viabilidad de las células madre.^{74,102}

La Survivina tiene un papel importante en la mitosis y en la estabilidad de los microtúbulos.¹⁶⁰ En las células normales de individuos adultos, el gen de la Survivina se encuentra desactivado, pero en las células tumorales este gen se reactiva y permite que las células transformadas escapen a los mecanismos de control, lo que permitirá su división autónoma. La Survivina se encuentra sobreexpresada en gran número de neoplasias, pero suele ser indetectable en la mayoría de los tejidos sanos diferenciados.^{4,132,188} El gen de Survivina está localizado en el cromosoma 11 E2 y contiene cuatro exones. Además los clones de la Survivina cDNA predicen que existen tres distintos tipos o isoformas de Survivina.⁴² La presencia de distintas isoformas de la Survivina, las cuales son expresadas diferencialmente, sugiere que esta molécula realiza un papel complejo en la regulación de la apoptosis.⁴² El gen de la Survivina es uno de los genes que se reprime transcripcionalmente por p53 y la expresión de Survivina antagoniza la muerte celular inducida por p53.⁸⁴ Si bien la capacidad de la Survivina para inhibir la apoptosis está completamente demostrada, los mecanismos íntimos de regulación no se conocen bien. Se ha sugerido que la Survivina ejerce su función inhibidora bloqueando los procesos de apoptosis dependientes de la caspasa 9 y de la cascada Smac/DIABLO. Además de esta actividad antiapoptótica, la Survivina tiene un papel importante en la mitosis y en la estabilidad de microtúbulos.¹⁷⁰ En la actualidad, la evaluación de la Survivina es de máximo interés, ya que se han obtenido novedosos avances terapéuticos en relación con su expresión. En este sentido, estudios *in vitro* de células de carcinoma de mama han demostrado que, cuando se suprime la señalización de Stat3 y la expresión de Survivina, además de inducir apoptosis, tiene la capacidad de sensibilizar al tumor frente a la quimioterapia.⁷⁴

La Survivina siempre se expresa en el citoplasma de las células normales y su expresión se incrementa significativamente en el citosol y en las membranas citoplasmáticas de las

células transformadas. Pero además, en varios tumores epiteliales y mesenquimales e incluso en tumores malignos de células germinales del testículo,²¹ se ha descrito una localización nuclear de la Survivina, sobre todo de las lesiones de alto grado, sugiriendo que existe una translocación nuclear de esta proteína, la cual se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna. La inmunoeexpresión de Survivina, tanto en citoplasma como en el núcleo, habitualmente se considera positiva cuando son positivas más del 10% de las células inmunomarcadas. Se ha publicado aumento de la inmunoeexpresión de Survivina en neoplasias malignas de distintas localizaciones como pulmón,¹²⁸ mama,¹⁷⁵ ovario,¹⁹⁸ colon,⁹⁷ estómago,^{112,139} hígado,⁹¹ vejiga,¹⁷² piel⁷⁵ y también en melanoma.⁷⁵ En relación con el cáncer de mama, se ha encontrado una fuerte asociación de la expresión de Survivina en aquellos carcinomas clasificados como de patrón basal y en estos casos la intensidad de la expresión de Survivina se relacionó con un peor pronóstico.^{39,102,135} En el carcinoma endometrial, la intensa inmunoeexpresión nuclear y citoplasmática se correlaciona con el índice de proliferación, estadio clínico, grado histológico, evolución y supervivencia de las pacientes.¹⁷³ En el carcinoma renal, Parker *et al.*, 2006^{144,145} publicaron que los pacientes con expresión alta de Survivina tenían mayor riesgo de muerte que aquellos pacientes con niveles bajos de expresión; sin embargo, Baytekin *et al.*, 2009¹⁷ no encontraron correlación entre la expresión de Survivina y la supervivencia en pacientes, pero sugirieron que la alta expresión podría estar relacionada con resistencia a la quimioterapia.¹⁷ En definitiva, la expresión de Survivina en los carcinomas se asocia a unas características histológicas desfavorables y a una peor supervivencia, sin embargo, en algunos carcinomas como el de estómago o el carcinoma urotelial de vejiga se ha asociado a una mejor supervivencia general¹³⁹ y mejor supervivencia libre de enfermedad respectivamente.¹⁰³

En carcinomas de la cavidad y en lesiones premalignas se ha publicado una inmunorreactividad positiva de Survivina en el 72% de los carcinomas orales y en el 44% de las lesiones premalignas.⁹⁸ En este estudio se ha encontrado una correlación entre la expresión de p53 y Survivina y además el número de células con expresión de Survivina fue mayor en el grupo de lesiones p53-positivas, y aproximadamente la mitad de los carcinomas y lesiones premalignas con expresión de p53 también mostraron inmunomarcaje con Survivina.⁹⁸ De otra parte en el carcinoma transicional de vejiga también se encontró una

buena correlación entre los niveles de Survivina y el índice proliferativo Ki67.¹⁹⁶ Por último, la expresión de Survivina también fue significativamente mayor que la de p53 en pacientes con esófago de Barrett, así como en biopsias de esófago con displasias de bajo grado y con displasias de alto grado.¹⁴²

En definitiva, estas nuevas moléculas -Survivina, Aurora A y Aurora B- implicadas en la regulación del ciclo celular y que tan relevante actualidad tienen en el estudio de diferentes tipos de tumores malignos, se suelen co-expresar en el mismo tumor, y también se pueden relacionar con marcadores clásicos de proliferación celular -Ki67 y p53-, aunque el grado de correlación entre estas moléculas es generalmente bajo. En este sentido, en un estudio de cáncer de ovario se ha visto que la expresión de Aurora A se asoció a la de Ki67 en un 80% de los casos, pero la expresión de Aurora B no se asoció con el índice de proliferación,¹¹⁹ tampoco en estos tumores malignos de ovario se encontró relación entre la expresión de Aurora A y B y el estado de p53.^{119,120} Contrariamente, si se observó una correlación significativa entre la expresión de Survivina, Aurora B y Ki67 en carcinomas de cabeza y cuello,¹⁴⁹ y también se ha visto una correlación positiva entre la expresión de Aurora B y la Survivina en un estudio de diferentes tipos de carcinomas de pulmón.¹⁸¹

La **Fosfosurvivina** también denominada p-Survivina o Survivina mutada se ha explorado en algunos tumores malignos junto con la Survivina, aunque los resultados obtenidos han sido menos concluyentes.^{91,139,175}

BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR DE LOS CARCINOMAS CUTÁNEOS

En los casos de los carcinomas cutáneos no melanocíticos, la exposición continua y durante mucho tiempo a las radiaciones ultravioletas es el factor patogénico más importante de desarrollo del tumor,¹⁰⁶ debido a una inducción de fotoproductos que alteran el ADN y provocan mutaciones.⁵ Así mismo, se sabe que los cánceres cutáneos se producen por una expansión clonal anormal de células madre de la epidermis que sufren alteraciones genéticas.⁷² En el inicio de los cánceres cutáneos se han implicado, entre otros, tres tipos de genes: los protooncogenes, que estimulan el crecimiento, los antioncogenes, que inhiben el crecimiento, y los genes que regulan la apoptosis o muerte celular programada.¹⁴¹ En los

cánceres de piel son más frecuentes las alteraciones de los genes de supresión tumoral que las de los oncogenes.¹⁹⁹ Los productos polipeptídicos de los genes supresores del cáncer cutáneo, son componentes de la vía de inhibición del crecimiento y moléculas que regulan la transcripción nuclear y el ciclo celular.^{27,28}

De otra parte, se sabe que el cáncer de piel está regulado por factores de crecimiento que poseen una actividad intrínseca tirosín-quinasa, que regula señales implicadas en la diferenciación y proliferación celular; entre estos factores de crecimiento, en los carcinomas cutáneos destaca el factor de crecimiento epidérmico, EGF.¹⁸⁰ Las proteínas de transducción de señales oncogénicas, situadas en la parte interna de la membrana celular, se encargan de transmitir las señales al núcleo. Este grupo de proteínas de señalización es heterogéneo, siendo el mejor conocido la familia de proteínas Ras, dado que las mutaciones de estos genes Ras se han encontrado en muchos tipo de tumores humanos.¹⁶ En concreto, en el cáncer de piel, la mutación del gen H-Ras tiene mucha importancia.⁷²

El p53 y el p63 son genes que se encuentran expresados en los procesos de replicación de los queratinocitos. El p53 se encontró expresado en todos los casos de EB, casi en todos de los casos de CE y de forma moderada en los casos de queratosis actínicas;¹⁹⁷ sin embargo, los casos de queratosis actínicas con un ligero mayor porcentaje de inmunopositividad del p53 tienen mayor probabilidad de desarrollar un CE.²⁸ La exposición solar continuada, junto con otros factores genéticos o ambientales, es también responsable del desarrollo de un EB, observándose primeramente un progresivo aumento de mutaciones de p53 y después la aparición tardía del EB,⁴⁶ mientras que la exposición de forma intensa al sol, pero puntual en la infancia y adolescencia, favorece la aparición precoz del EB en las personas genéticamente predispuestas.⁴⁸

La Survivina se expresa en hiperplasias y neoplasias de queratinocitos epidérmicos,^{27,28,75} y además, en muchos tumores cutáneos la expresión de la Survivina se asocia con la expresión de p53 y p63.¹⁴³ La Survivina se ha detectado en lesiones preneoplásicas de la piel, tales como la enfermedad de Bowen, las queratosis actínicas y los poroqueratomas.⁷⁵ En los CE cutáneos se ha publicado que la Survivina se expresó en ocho de diez casos estudiados y también la Survivina se incrementó en seis de diez casos

diagnosticados de EB. Así mismo, la expresión de la Survivina está aumentada en la enfermedad de Bowen y en pacientes con lesiones de queratosis actínicas, siendo en estos casos más evidentes, la inmunoexpresión de Survivina en la capa basal del epitelio queratósico. Todos estos datos indican que la Survivina tiene un cierto papel en el desarrollo del carcinoma cutáneo y un papel en la inhibición de los mecanismos de la homeostasis epidérmica.⁴⁴

En definitiva, el incremento de la expresión Ki 67 y p53, con respecto a la piel normal, en biopsias de queratosis actínicas y enfermedad de Bowen sugiere que ambas moléculas están implicadas en la malignización de estas enfermedades cutáneas preneoplásicas y la posibilidad de que estos pacientes desarrollen un CE infiltrante.^{19,138,174}

QUERATOSIS ACTÍNICAS

Además de los CE, en la piel se pueden desarrollar proliferaciones de la epidermis denominadas queratosis actínicas, también conocidas como queratosis solares. Las queratosis actínicas se han clasificado en los siguientes tipos: queratosis actínicas comunes, queratosis actínicas hipertróficas, queratosis actínicas atróficas, queratosis actínicas acantolíticas, queratosis actínicas pigmentadas y queratosis actínicas Bowenoides.¹³⁶ Las queratosis actínicas pueden progresar a un CE de la piel;¹⁵³ sin embargo, no se puede predecir cuáles de estos pacientes con queratosis actínica desarrollarán un CE infiltrante, pero la evidencia histológica indica que la mayoría de los CE se originan en lesiones de queratosis actínicas.¹⁰⁷ Entre el 0.025% y el 16% de las queratosis actínicas diagnosticadas desarrollarán un CE en el primer año después de aparecer la lesión.¹⁶⁶ Por ello, el diagnóstico precoz y el tratamiento consecuente temprano reducen los daños deletéreos de las queratosis actínicas¹⁶³ y por ende disminuyen el riesgo de padecer CE invasivos.¹⁵³ De hecho, algunos autores opinan que en algunos casos muy evolucionados de queratosis actínicas pueden ser considerados verdaderos carcinomas in situ intraepidérmicos,⁵⁶ pero la mayoría de los casos de queratosis actínica, aunque no son propiamente cánceres cutáneos, sí son lesiones precancerosas, puesto que histológicamente su principal característica es la displasia epitelial.

La etiología de la queratosis actínica es la exposición crónica, continuada y acumulativa o intermitente pero intensa, a las radiaciones ultravioletas y por ello las lesiones frecuentemente aparecen en áreas de piel expuestas al sol generalmente en pacientes adultos de mediana o avanzada edad.¹¹³ En las zonas fotoexpuestas son más proclives a presentar lesiones de queratosis actínica los individuos de piel clara, ojos claros, pelo rubio o pelirrojo, en definitiva las personas que tienen un fototipo de piel grado I y II.

Se sabe que la excesiva exposición a los rayos ultravioleta induce una cascada de cambios moleculares a nivel celular, tales como inflamación, inmunosupresión, fallo de la apoptosis y diferenciación anómala de los queratinocitos, lo que puede determinar mutaciones de genes y desencadenar los mecanismos de carcinogénesis. En las queratosis actínicas se han descrito mutaciones en el gen p53 de los queratinocitos que inician una transformación anómala. Las radiaciones solares ultravioletas tienen tres longitudes de onda diferentes: UVC (200-290nm), UVB (290-320nm) y UVA (320-400nm). La banda de radiaciones UVB llega a la atmósfera terrestre en un 5%, la banda UVA en un 95% y no llega nada de la banda UVC; sin duda, la banda de los rayos UVB es más carcinogénica que los rayos UVA, puesto que producen un daño directo sobre el ADN, mientras que los rayos UVA dañan al ADN de forma indirecta, al generar radicales libres de oxígeno (ROS).²⁰

Clínicamente las queratosis actínicas se presentan como máculas o pápulas eritematosas, que están recubiertas por una escama adherente, y pueden ser pruriginosas, evolucionado en algunos casos con ulceración posterior; generalmente tienen un centímetro de diámetro y suelen ser múltiples en las zonas fotoexpuestas: nariz, frente, pabellones auriculares y labios, dorso de manos y cuero cabelludo.¹⁵³ En algunos pacientes pueden aparecer como pápulas engrosadas y queratósicas (las denominadas queratosis actínicas hipertróficas) y que pueden llegar a ser excrecentes y formar un cuerno cutáneo.¹⁵³

La histopatología de las queratosis actínicas se caracteriza por una paraqueratosis focal, con pérdida de la capa granulosa y moderado engrosamiento de la epidermis.⁵⁶ Excepcionalmente la epidermis puede estar adelgazada. Se pierde la correcta estratificación de la epidermis y se asocia a una mayor atipia de los queratinocitos. La displasia puede extenderse por la porción infundibular del folículo piloso. A veces las paraqueratosis son tan

intensas que pueden dar lugar a cuernos cutáneos. Las queratosis actínicas hiperplásicas o hipertróficas se caracterizan por ortoqueratosis y paraqueratosis prominente, acompañada de una epidermis con hiperplasia papilomatosa, con displasia queratinocítica moderada y limitada a la capa basal o una displasia intensa que se extiende a todos los estratos de la epidermis.

El diagnóstico de las queratosis actínicas debe diferenciarse de las siguientes entidades: queratosis seborreica, la verruga vulgar, psoriasis, lupus eritematoso, cuerno cutáneo secundario a verruga, la enfermedad de Bowen,¹⁵⁹ el CE, el EB, el léntigo solar y el léntigo maligno. Sin duda, lo más importante es diferenciar histológicamente una queratosis actínica de un CE microinfiltrante. En estos casos, la presencia de células atípicas en el dermis reticular y el desprendimiento de pequeños nidos de queratinocitos de las capas bajas de la epidermis hacia el dermis es criterio suficiente para diagnosticar una neoplasia infiltrante; sin embargo, en el caso de los tumores cutáneos la infiltración exclusiva del dermis papilar no implica una capacidad metastásica y, por lo tanto, en los casos de duda y desde un punto de vista práctico para el paciente, se debe considerar la lesión como una queratosis actínica, máxime que, si bien las queratosis actínicas son precursoras de una lesión cutánea maligna, no todas van a evolucionar inexorablemente hacia un CE. Con todo, es necesario tener en cuenta que aquéllos casos de queratosis actínicas que tengan un diámetro mayor de un centímetro, rápido crecimiento, ulceración y sangrado sugieren un mayor riesgo de progresión de la enfermedad hacia la malignización.

Además también son factores de riesgo del desarrollo y progresión de una queratosis actínica la exposición solar aumentada, la edad avanzada, los tratamientos inmunodepresores, los antecedentes familiares de cáncer de piel, la positividad de VIH, así como los casos de trasplantes de órganos sólidos.¹⁵⁴ Sin duda, el diagnóstico precoz y el tratamiento temprano, disminuyen el riesgo de la transformación de la queratosis actínica en CE. El tratamiento de las queratosis actínicas se debe realizar como medida preventiva, aunque el riesgo de progresión a neoplasia maligna invasiva sea menor del 1%. Los tratamientos médicos y quirúrgicos de las queratosis actínicas son diversos y su elección dependerá de las características de cada paciente y del tamaño, número y localización

anatómica de las lesiones. Entre los tratamientos quirúrgicos se incluyen la criocirugía, el curetaje, la extirpación quirúrgica⁹⁰ y la exéresis con láser de CO₂ ablativo. En el caso particular de las lesiones de queratosis actínicas parpebrales, la mayoría de cirujanos plásticos realizan la extirpación de lesiones queratinocíticas perioculares de forma ablativa, frente a un porcentaje mucho menor de los mismos que realizan la extirpación con cirugía de Mohs.¹⁰⁰

Entre los tratamientos médicos de las queratosis actínicas destacan la aplicación de los siguientes fármacos: 5-Fluoracilo (agente citotóxico que destruye los queratinocitos displásicos), Imiquimod (agente inmunomodulador), Diclofenaco gel, retinoides y ácido levulínico que es un agente fotosensibilizante aplicado por terapia fotodinámica. En efecto, mención especial merece el 5-fluoracilo (Efudix 5%), el cual actúa bloqueando la síntesis del ADN, por inhibición de la enzima timidilatosintetasa; sin embargo, su uso puede tener efectos adversos, tales como una intensa reacción inflamatoria local e incluso dolorosa y además tiene la desventaja de necesitar un tiempo prolongado de tratamiento, además su aplicación exige evitar la exposición al sol, ya que el agente aumenta la fotosensibilidad del área tratada.^{13,70,170}

La terapia fotodinámica es bien sabido que consiste en la aplicación de una sustancia fotosensibilizante y la iluminación posterior de la lesión con luz roja, para producir moléculas de oxígeno activo que destruyen de forma selectiva las células diana. Suele utilizarse el ácido 5aminolevulínico (ALA) y el metaminolevulinato (MAL)⁷ que producen una disminución en la expresión de los marcadores de proliferación celular Ki67 y p53.⁷

Algunos estudios han publicado que la terapia fotodinámica obtiene una respuesta del 90% en queratosis actínicas y del 93% en los pacientes diagnosticados de enfermedad de Bowen. La gran ventaja de la terapia fotodinámica es que se puede aplicar varias veces y que además su aplicación no interfiere con un posterior tratamiento quirúrgico. Las principales limitaciones de la terapia fotodinámica es la baja capacidad de penetración en la piel, lo que dificulta el tratamiento de las queratosis actínicas muy evolucionadas, y, de otra parte produce discomfort de los pacientes por el dolor y el tiempo prolongado de tratamiento.^{68,70,170,194} Con el fin de evitar el dolor, recientemente se propone aplicar la

terapia fotodinámica con luz de día mediatizada, previa aplicación de protector solar en crema, obteniendo buenos resultados, sobre todo en los pacientes con áreas extensas de lesiones de queratosis actínicas.

La aplicación en las queratosis actínicas del Imiquimod (Aldara 5%) (un modulador de la respuesta inmune, con actividad antivírica y antitumoral) induce la liberación local del interferón alfa, del factor de necrosis tumoral alfa y de otras citocinas que estimulan la respuesta inmunitaria, tanto humoral como celular y adicionalmente tiene la capacidad de inducir la apoptosis de las células tumorales. En el tratamiento de las queratosis actínicas la tasa de curación oscila entre el 45% y el 84% y parece que tiene mejores resultados que el uso del 5-fluoracilo.¹³

El Diclofenaco (Solaraze) es un antiinflamatorio no esteroideo que para el tratamiento de las queratosis actínicas ha sido formulado en gel tópico (al 3% en gel de ácido hialurónico al 2,5%). Actualmente solo está aprobado su uso en USA y, aunque su mecanismo de acción no es muy bien conocido, ha mostrado tener efecto antitumoral por inhibición del metabolismo del ácido araquidónico;¹³ sin embargo produce bastantes reacciones inflamatorias locales y hay descritos casos de dermatitis alérgica de contacto. Los efectos antiproliferativos del Diclofenaco determinan la disminución de la expresión nuclear de los marcadores de proliferación celular Ki 67 y p63, pero estudios clínicos demuestran que el Diclofenaco es menos eficaz que el 5-fluoracilo.³⁴ Por último, los Retinoides tópicos, productos análogos a la vitamina A y presentes en muchos productos cosméticos, se les consideran agentes con cierto efecto, aunque muy dudoso, de quimio-prevención, por lo que su uso en las queratosis actínicas está muy criticado.

En el presente estudio se pretende investigar el comportamiento de distintas moléculas reguladoras del ciclo celular, tales como las Auroras A y B, cuya expresión ha sido bien establecida en otros tumores malignos.^{61,86} También se ha cuantificado la expresión de Survivina,¹⁸⁹ en relación con el índice proliferación Ki67 y de la expresión de p53, tal como se ha demostrado en tumores malignos cutáneos y de otros órganos.^{130,131,162,167,182,183} Para este estudio se han valorado estas moléculas en una serie de CE cutáneos en los que en el mismo caso se han identificado tanto áreas de CE bien diferenciado, como otras áreas

tumorales con pobre diferenciación; así mismo, también se han evaluado las mismas moléculas en casos diagnosticados de queratosis actínicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

PRIMERA. ¿Existen cambios de la expresión de las moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia Aurora quinasas y de Survivina y Fosfosurvivina en los carcinomas epidermoides cutáneos primarios y recidivantes y en las lesiones precancerosas de queratosis actínicas?

OBJETIVOS

PRIMERO. Describir las peculiaridades clínicas y quirúrgicas de los carcinomas epidermoides cutáneos y de casos diagnosticados de queratosis actínicas evolucionadas.

SEGUNDO. Evaluar las nuevas moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia Aurora quinasas, Survivina y Fosfosurvivina en relación con la expresión de Ki67 y p53, en los carcinomas epidermoides bien y pobremente diferenciados y en las queratosis actínicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

En este estudio, se ha evaluado la expresión inmunohistoquímica de varias nuevas moléculas relacionadas con el ciclo celular de 30 casos diagnosticados de CE primarios y recidivantes de piel, utilizando tejidos histológicos previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de los archivos del Laboratorio de Anatomía Patológica del Dr. Enrique Niembro. Se consideraron dos patrones de diferenciación en los CE: áreas tumorales de CE bien diferenciados y áreas en los que predominaba el patrón de CE moderada o pobremente diferenciado; sin embargo, todos los tumores extirpados contenían estos dos patrones de diferenciación tumoral, bien en la misma preparación histológica o bien en preparaciones correspondientes a diferentes áreas del tumor. También se han evaluado 10 casos de Queratosis Actínica, diagnosticados por la Dra. María Beato en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid.

MÉTODOS

Métodos de Estudio Histológico General

Fijación de las Piezas

Las piezas quirúrgicas se fijaron por inmersión en formol neutro tamponado al 4%, durante 24-48 horas.

Tabla 3. Fijación de las biopsias cutáneas

Formol Tamponado	
Fosfato monosódico, monohidrato	4,00 g
Fosfato disódico anhidro	6,50 g
Agua destilada	900 ml
Formol puro (CH ₂ O 40%)	100 ml

Métodos de Secciones con Microtomo y Tinciones Histológicas

De cada tejido cutáneo se realizó al menos una sección longitudinal central y de las dos más laterales se realizaron cortes perpendiculares a la sección anterior, con el fin de

delimitar la posible infiltración por el tumor de los bordes quirúrgicos de la piel extirpada. A continuación, se procedió a la inclusión en parafina, bien de toda la pieza si era pequeña o bien de secciones seleccionadas al azar. La inclusión en parafina se realizó en el procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió efectuar la deshidratación de las secciones fijadas mediante pases consecutivos en alcohol de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo, dando dos pases de una hora cada uno. Finalmente las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60º C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor, mediante un microtomo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®, y las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), PAS (ácido peryódico y reactivo de Schiff, con y sin digestión por la diastasa), tricrómico de Masson y técnica de fibras elásticas con coloración de van Giesen (EVG), siguiendo los métodos histológicos habituales. Las preparaciones de HE recién teñidas se aclararon en agua destilada. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

Método Inmunohistoquímico de la Expresión Proteica

Para estudiar la expresión de todas las moléculas evaluadas en los CE y en las Queratosis Actínicas, se ha utilizado, en primer lugar, el método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP), con el fin de hacer en algunos casos seleccionados al azar una evaluación previa de las condiciones metodológicas específicas para cada anticuerpo usado; y ya en segundo lugar, en todos los casos incluidos en nuestro material, se realizó una detección de los diferentes epítomos estudiados, mediante el método de Envision (Dako).

En la Tabla 4 Se incluyen los anticuerpos utilizados, su clon -en el caso de que se trate de un anticuerpo monoclonal-, nombre de la casa comercial suministradora y dilución de trabajo en nuestro laboratorio

Tabla 4. Relación de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Clon	Casa	Dilución
Ki-67	MIB-1	Dako	1:100
p53	MIB-1	Dako	1:100
Aurora A (STK15)	JLM28	Novocastra Laboratories	1:50
Aurora B	Policlonal	Abcam pcl	1:50
Survivina	Policlonal	Abcam pcl	1:400
Fosfosurvivina	Policlonal	Abcam pcl	1:400

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP o el método Envision, con el fin de la detección de la expresión de estos 6 anticuerpos, se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor del material incluido en parafina y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polilisina, (Sigma, St Louis), cuando se usó el método SBP o con xilano (Sigma, St Louis), cuando se usó el método Envision, con el fin de adherir mejor el corte al portaobjetos.

1. Método Inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)

Se realizó el método general inmunohistoquímico de SBP, descrito por Hsu, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,^{26,69,111} que se especifican a continuación: Primeramente se realizó la desparafinación completa de las secciones, seguido de la hidratación en alcoholes decrecientes hasta el agua destilada. A continuación se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante peróxido de hidrógeno al 3% a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS) a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desenmascaramiento del epítipo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con micro-ondas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases.²⁷ Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante

20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un lavado rápido, dos minutos, en H₂O destilada para retirar el sobrenadante del buffer citrato. Lavamos las preparaciones en dos pases de 5 minutos en buffer PBS, pH 7,4. Seguidamente, realizamos el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos con suero bovino normal durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente. Con el fin de identificar cada uno de los epítomos evaluados se añadió en cada preparación el anticuerpo específico correspondiente (Tabla 4), diluidos en una solución de PBS+ BSA al 1%. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a las secciones el complejo biotinilado anti-ratón o anti-conejo (dependiendo si el anticuerpo primario es monoclonal o policlonal), a una dilución 1:200, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y también a temperatura ambiente. Se incubaron las preparaciones en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Realizamos tres lavados en PBS durante 5 minutos. La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7,4 y con H₂O₂ al 0,015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina es de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

2. Método Inmunohistoquímico de Envision

El estudio inmunohistoquímico de la expresión proteica se realizó mediante el método Envision (Dako) utilizando anticuerpos mono o policlonales frente a la serie de anticuerpos establecida (ver tabla 4). Brevemente, tras la desparafinización e hidratación de los tejidos en una serie de alcoholes decrecientes hasta el agua destilada se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena durante 10 minutos. A continuación, las muestras se lavaron con agua destilada y se realizó el desenmascaramiento antigénico con EDTA a 150°C durante 45

minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron de nuevo en agua destilada y a continuación en tampón Tris pH=7,4 a temperatura ambiente. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Las muestras se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se añadió el anticuerpo secundario conjugado. Por último, las muestra se lavaron en tampón Tris pH=7,4 y se revelaron mediante la aplicación del cromógeno diaminobencidina, durante 5 minutos. Con el fin de visualizar los núcleos, se realizó contratinción con hematoxilina. Este procedimiento se realizó utilizando el inmunoteñidor automático Techmate500 (Dako).

Cuantificación

En las áreas de CE bien diferenciado y en aquellas que tenían masas tumorales infiltrantes con diferenciación moderada o pobre, se cuantificaron el número de células inmunomarcadas con cada uno de los anticuerpos utilizados, y también se cuantificaron los núcleos rigurosamente negativos o que sólo mostraban vestigios de inmunomarcaje nuclear. Los datos se expresaron en porcentajes de núcleos de CE inmunomarcados, con respecto al total de núcleos de células tumorales de cada campo microscópico cuantificado. El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar después las cuantificaciones histométricas, se describe a continuación brevemente: Las áreas seleccionadas para las cuantificaciones fueron aquellas que, habiendo sido valoradas por dos patólogos, se consideraron adecuadas por no presentar necrosis, abscesos y hemorragias en el tejido tumoral. La selección de campos dentro de las áreas se llevó a cabo aleatoriamente; el límite exterior de las áreas se dibujó sobre la laminilla y ésta se desplazó sin sobrepasar los límites marcados y sin realizar valoraciones subjetivas de visualización directa de los campos microscópicos elegidos.

Se escogieron 10 campos en cada área previamente delimitada, ya que usualmente éste es el número que se selecciona para una visualización de distribución espacial homogénea. Se verificaron dos métodos de selección de campos microscópicos para una superficie dada. En el primero, denominado de "selección subjetiva", uno de los más usados hasta este momento, un observador selecciona diez campos asegurándose de que estén distribuidos homogéneamente sobre la superficie seleccionada. Este método, rápido y sencillo, pudiera fácilmente ser sesgado. Las posibilidades de sesgo generadas por el

muestreo objetivo de este estudio fue comprobado utilizando un segundo método, denominado de "selección aleatoria", la cual es no sesgada. Para este propósito, se utilizó un retículo para dividir la superficie del campo en 100 partes iguales. A cada campo se le asignó una combinación de dos dígitos, y a través del uso de una tabla de números al azar se escogieron 10 combinaciones. Este método es más laborioso pero garantiza la ausencia de sesgo. Los dos métodos se utilizaron para seleccionar los campos en cada sección. En cada campo microscópico, tomado con un objetivo de 40 aumentos, se contaron las células inmuomarcadas con cada anticuerpo.

Técnicas Fotográficas

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop CS4. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press 6.0.

RESULTADOS

DATOS CLÍNICOS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMOIDES CUTÁNEOS

En la serie objeto de este estudio, la mayoría de los casos de CE se desarrollaron en pacientes de edades comprendidas entre los sesenta y ocho y los noventa y un años; mientras que, solamente tres casos se diagnosticaron en pacientes relativamente jóvenes (edades comprendidas entre los cincuenta y seis y los sesenta años). Los casos de CE estudiados fueron diagnosticados mayoritariamente en varones (veintidós de treinta casos). Preferentemente las lesiones se desarrollaron en zonas expuestas al sol, incluyendo la cara y la cabeza (veinticuatro de treinta casos); en mucha menor medida los CE se localizaron en el miembro superior (tres casos en mano), y los tres restantes en hombro, espalda y pierna, zonas mucho menos expuestas al sol. Los tamaños de las lesiones tumorales oscilaron entre los 0,6 cm y los 2 cm de diámetro, habiéndose estudiado solamente cuatro casos de muy pequeña dimensión (diámetro comprendido entre 0,2 cm y 0,5 cm).

Los CE fueron predominantemente primarios (26 de 30 casos) y solamente cuatro fueron recidivas de otras lesiones previas de CE. El tiempo transcurrido entre la aparición de la lesión y la extirpación quirúrgica estuvo comprendido entre los 6 y los 24 meses, y solamente se encontraron cuatro casos de rápida evolución (entre 2 y 5 meses). La forma de presentación clínica de los CE estudiados consistió en una tumoración ulcerada y crateriforme en la gran mayoría de los casos (25 de 30 casos); mientras que, en sólo unos cinco casos el CE aparecía como una lesión de aspecto nodular y queratósico.

La intervención quirúrgica consistió en la exéresis de la tumoración, realizándose extirpación y plastia por cierre directo, con un margen de seguridad comprendido entre 2 y 5 mm, y solamente en dos casos se realizó la exéresis con un margen de 10 mm. En otros dos casos, tras la exéresis de la tumoración, fue necesario realizar un colgajo dermo-epidérmico de vecindad. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron exclusivamente con anestesia loco-regional; pero en algunos casos se asoció a una sedación intravenosa (generalmente en pacientes varones). Se trataron como casos de cirugía ambulatoria; sin embargo, en los casos de sedación intravenosa fue necesario un seguimiento postoperatorio con estancia en Hospital de Día. La retirada de los puntos osciló entre los siete y los catorce días. Se realizaron una media de tres a cuatro curas en consultas externas en cada paciente. El

período postoperatorio osciló entre los siete y los quince días, con un tiempo de incorporación a la vida socio-laboral y de actividades cotidianas de unos tres a cuatro días.

Tabla 5. Datos Clínicos de los Carcinomas Epidermoides de Piel.

Caso	E/ S	Localización	T (cm)	P/R	TE	Clínica	Cirugía	Diagnóstico Clínico	Diagnost Patol	Bordes
1	91 M	Cara Frente	1,5	P	24	Ulcerada nodular	Ext.C.D.mrg 5mm	CE	CEPD	B.R.
2	59 V	Cabeza oreja dcha.	1,8	P	10	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 10 mm	CE	CEPD	B.R.
3	60 V	Cabeza oreja dcha.	0,5	R	5	Ulcerada	Ext. C.D.mrg 3 mm	CE	CEBD	B.A.
4	79 V	Cara Parpado	0,4	P	6	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm	CE	CEPD	B.R.
5	80 V	Cara frente	2,0	P	6	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 5mm	CE	CEPD	B.R.
6	81 V	Cabeza Reg. Temporal izq.	1,0	P	10	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm	CE	CEPD	B.R.
7	82 V	Mano	2,0	P	24	Ulcerada queratósica	Ext.C.D.mrg 10 mm	CE	CEBD	B.R.
8	79 M	Cara Ala nasal	0,4	P	24	Ulcerada	Ext. C.D.mrg 3 mm	EB	CEPD	B.A.
9	82 V	Mano	1,0	P	6	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 2 mm	CE	CEBD	B.R.
10	72 V	Cabeza Reg Parietal	2,0	P	24	Ulcerada nodular	Ext.C.D.mrg 5 mm	CE	CEPD	B.R.
11	76 V	Cabeza Oreja iz. Hélix	0,6	P	24	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 5 mm	EB	CEPD	B.R.
12	96 V	Cara	1,0	P	12	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm	CE	CEPD	B.R.
13	76 V	Cabeza Oreja iz. Hélix	0,8	R	2	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 m	CE	CEBD	B.R.
14	81 V	Pierna	2,0	P	12	Ulcerada	Ext.Colgajo mrg 5 mm	CE	CEBD	B.R.
15	84 V	Mano dedo 3	0,2	P	12	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 2 mm	CE	CEPD	B.R.
16	93 M	Cara	1,0	P	24	Cuerno Cutáneo	Ext. C.D.mrg 3 mm	CE	CEBD	B.A.
17	84 V	Hombro	1,0	P	6	Ulcerada nodular	Ext.C.D.mrg 5 m	CE	CEBD	B.R.

Tabla 5. Continuación.

Caso	E/ S	Localización	T (cm)	P/R	TE	Clínica	Cirugía	Diagnóstico Clínico	Diagnost Patol	Bordes
18	56 M	Cabeza Reg. Temp. Izda.	1,0	P	10	Nodular quístico	Ext.C.D.mrg 3 mm	EB	CEPD	B.R.
19	85 M	Cara Cant. Int. Ojo izd.	1,5	P	6	Nodular ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm	CE	CEBD	B.R.
20	81 V	Cabeza.Reg. parietal dcha.	1,0	P	12	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 5 mm	CE	CEPD	B.R.
21	85 M	Cara Cant. Int. Ojo. izq	0,6	R	2	Ulcerada queratósica	Ext.Colgajo mrg 5 mm	CE	CEBD	B.R.
22	74 V	Cabeza Reg. Temp. Dcha.	2,0	P	12	Ulcerada queratósica	Ext.C.D.mrg 5 mm	CE	CEBD	B.R.
23	96 V	Cabeza Reg. Parietal izq.	2,0	R	24	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 5 mm	CE	CEPD	B.R.
24	82 V	Cabeza Reg. Parietal izda	1,0	P	4	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 2 mm	CE	CEPD	B.R.
25	68 V	Cara	1,0	P	12	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm.	CE	CEPD	B.R.
26	73 V	Cara	1,0	P	12	Nodular	Ext.C.D.mrg 3 mm.	EB	CEPD	B.R.
27	69 V	Cara	1,0	P	6	Nodular	Ext.C.D.mrg 3 mm.	EB	CEBD	B.R.
28	79 M	Cara	1,0	P	12	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm.	CE	CEPD	B.R.
29	84 V	Cara	1,5	P	6	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm.	CE.	CEPD	B.R.
30	86 M	Espalda	1,5	P	10	Ulcerada	Ext.C.D.mrg 3 mm.	CE	CEPD	B.R.

E/S: Edad (años)/Sexo (M= Mujer y V=Varón); Localización; T: Tamaño; P/R: Tumor Primario/Recidiva; TE: Tiempo de evolución (meses); Ext.C.D.mrg: Extirpación por cierre directo y margen expresado en mm; CE: Carcinoma Epidermoide; EB: Epitelioma Basocelular; CEBD: Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado; CEPD: Carcinoma Epidermoide Poco Diferenciado; BR: Bordes Respetados; BA: Bordes Afectados.

Figura 1. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Ki 67

- a. Hiperplasia epitelial asociada a un carcinoma intraepitelial y con alto índice proliferativo.
- b. Importante actividad proliferativa de las células basales en el área de hiperplasia. Nótese una zona de displasia de células parabasales Ki 67 positivas.
- c. La intensa proliferación de células basales y suprabasales del CE intraepitelial se asocia a una intensa respuesta de células inflamatorias en el dermis superficial.
- d. Imagen de un carcinoma verrucoso en el que se ven áreas proliferativas con intenso índice proliferativo, que empujan al dermis papilar.
- e. Corte transversal de las yemas proliferativas de un carcinoma verrucoso, en el que el índice Ki 67 es superior al 69%.
- f. CE bien diferenciado, infiltrante y con extensa respuesta de células inmunocompetentes. El número de células Ki 67 positivas es relativamente bajo y mayoritariamente se visualiza en los queratinocitos basales y en los parabasales. **Inset:** Las células Ki 67 positivas son escasas y alternan con queratinocitos malignos con ciclo celular quiescente.
- g. La epidermis es normal, pero en el dermis superficial existen nidos tumorales y células malignas sueltas infiltrantes Ki 67 positivas.
- h. CE intraepitelial y nidos tumorales infiltrantes, formando globos córneos. La proliferación celular es baja.
- i. En algunas áreas, las células tumorales tienen un índice proliferativo muy bajo y restringido a la capa basal. La mayoría de las células malignas carecen de Ki 67.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

Ki 67

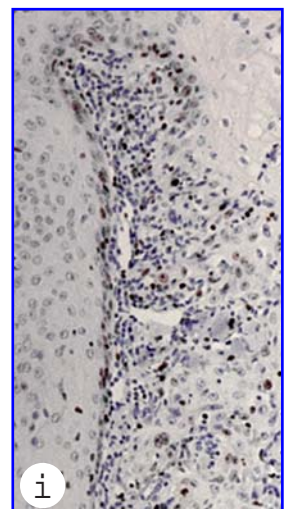
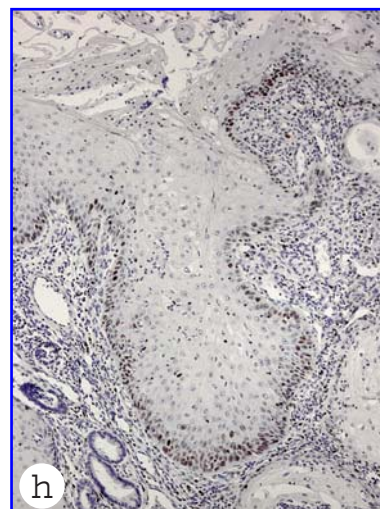
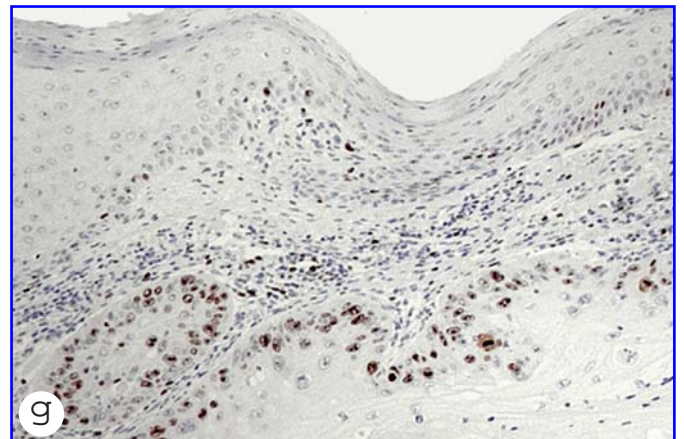
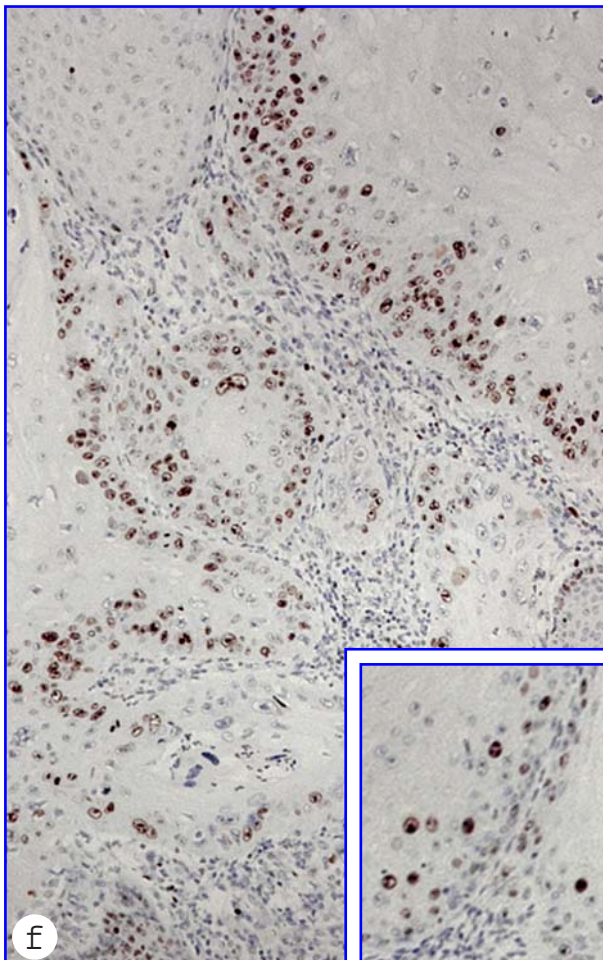
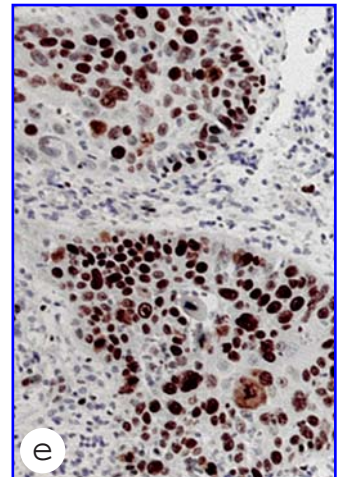
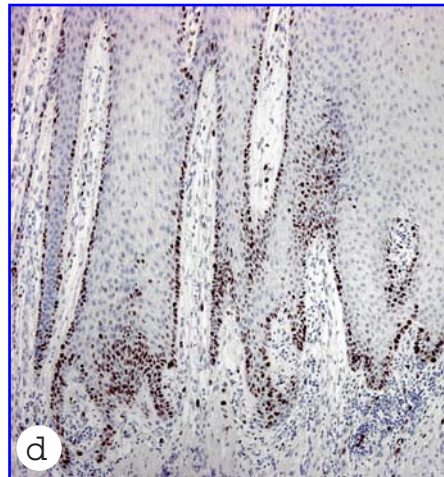
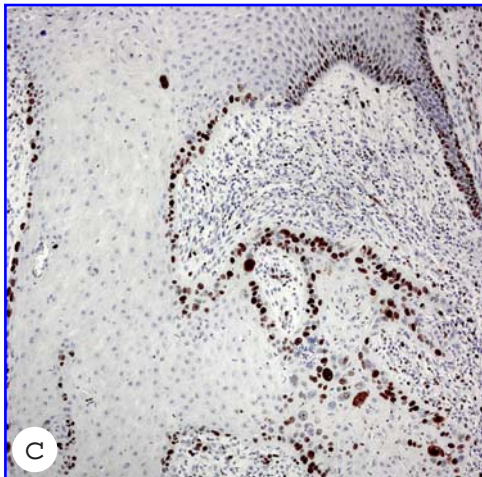
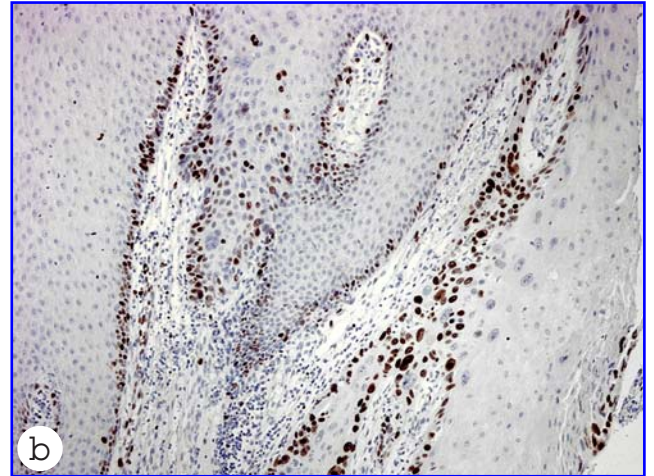
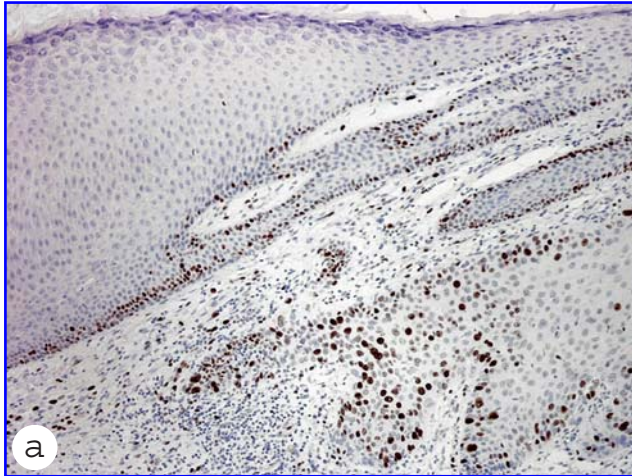


Figura 2. Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado - Ki 67

- a. La epidermis es normal, pero el dermis está ocupado por un extenso nódulo tumoral de células poco diferenciadas, con un alto índice proliferativo y una importante respuesta de células inflamatorias en la zona periférica del tumor.
- b. En los carcinomas intraepiteliales también pueden aparecer células tumorales desdiferenciadas, alguna de las cuales expresan Ki 67. **Inset:** Células desdiferenciadas de CE con un robusto marcaje Ki 67.
- c. Imagen panorámica de un CE poco diferenciado con zonas de necrosis y con un alto índice de proliferación celular.
- d. Se observa un carcinoma altamente proliferativo desdiferenciado e infiltrante, asociado a una moderada respuesta inflamatoria.
- e. La mayoría de las células malignas desdiferenciadas son Ki 67 positivas. En algunas zonas se observan necrobiosis y microabscesos tumorales.
- f. Interfase entre la masa tumoral, con alto índice Ki 67 positivo, y el dermis adyacente. En la zona periférica del tumor se observa una pseudocápsula, con reacción desmoplásica del tejido conjuntivo y abundantes infiltrados inflamatorios.

Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado

Ki 67

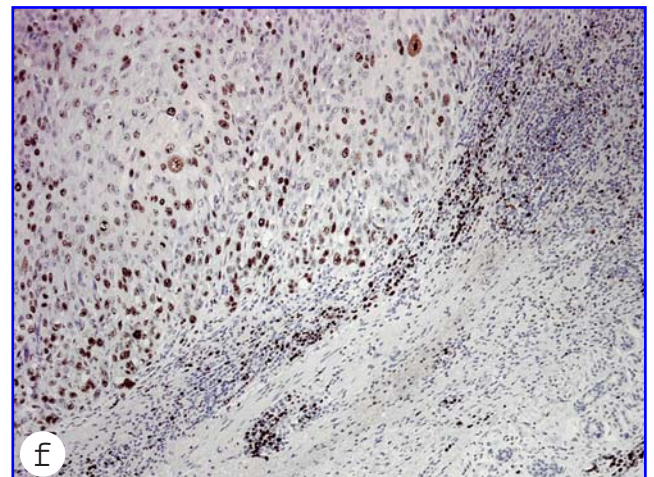
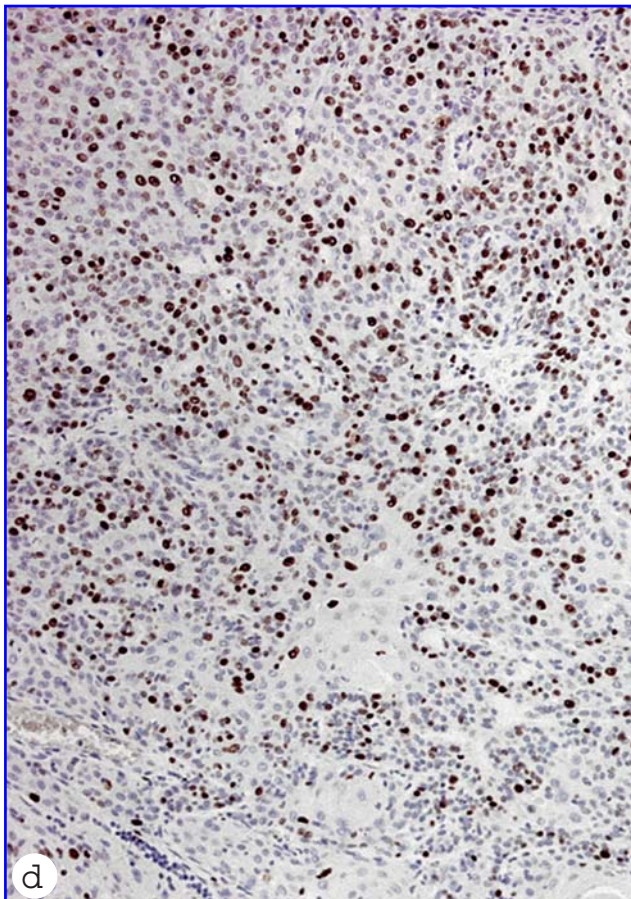
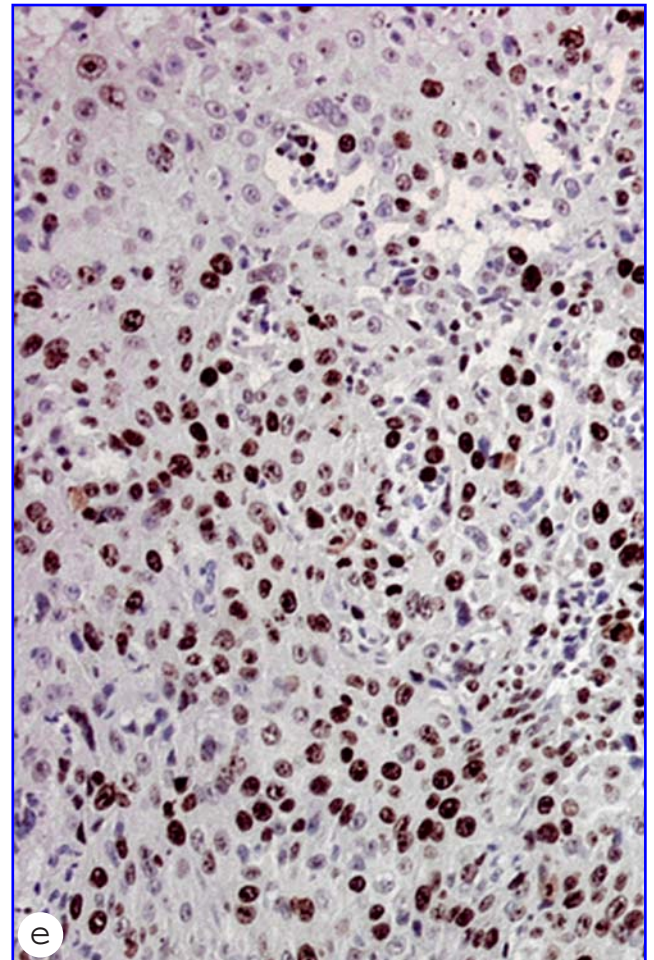
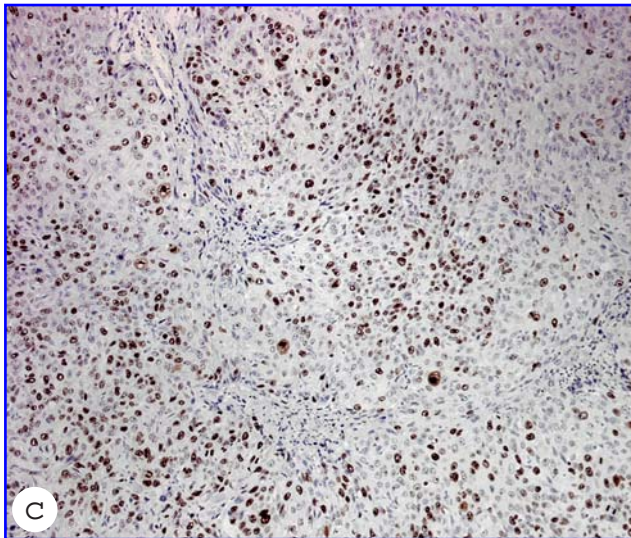
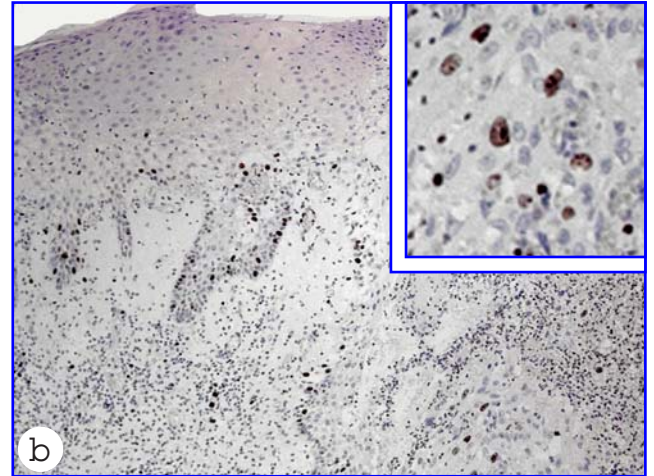
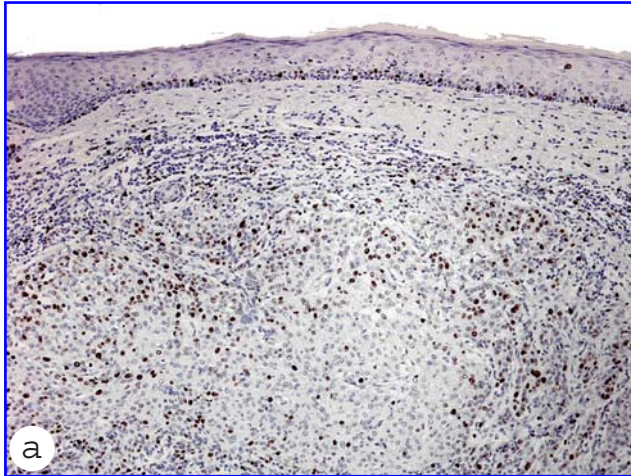


Figura 3. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - P53

- a. En la neoplasia intraepitelial, la mayoría de las células tumorales tienen una robusta expresión intranuclear de p53.
- b. La actividad de p53 es muy intensa en las yemas tumorales epidérmicas que penetran en el dermis papilar.
- c. CE bien diferenciado, las células basales expresan el oncogén p53, mientras que las células superficiales bien queratinizadas son rigurosamente negativas.
- d. Los nódulos tumorales están bien diferenciados y presentan una variable expresión de p53, la cual queda relegada a las células malignas basales y suprabasales, estando ausente en los queratinocitos escamosos.
- e. Imagen periférica de globos córneos, con positividad de p53 en todas las células basales y negatividad de expresión en las células escamosas planas superficiales.
- f. La epidermis muestra signos de hiperplasia, sin áreas de displasia. Sin embargo, todas las células basales y focalmente algunas suprabasales son positivas para p53, aún en ausencia de displasia epitelial. En el dermis se observan varios nódulos tumorales infiltrantes y en su periferia existe una alta positividad de p53. La respuesta inflamatoria peritumoral es masiva.
- g. Carcinoma verrucoso en la interfase con el dermis papilar. El índice de P53 es bajo y la mayoría de las células tumorales basales y escamosas son rigurosamente negativas.
- h. Se observa un incremento del número de células tumorales p53 positivas, tanto en la masa tumoral principal como en los dos nidos infiltrantes (parte inferior de la imagen), en los que todas las células expresan este oncogén. La respuesta de células inflamatorias desencadenada por este tumor es masiva.
- i. Epidermis con áreas de hiperplasia de queratinocitos basales, que forman un ribete aserrado con el dermis papilar, se ve una intensa respuesta de células inmunocompetentes. Todas las células basales tienen intensa expresión nuclear de p53.
- j. En la imagen se observan varias yemas de CE bien diferenciado que protruyen en el dermis. Destaca la heterogeneidad de la expresión de p53, siendo muy positivo en algunos nidos tumorales y prácticamente negativo en otros.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

p53

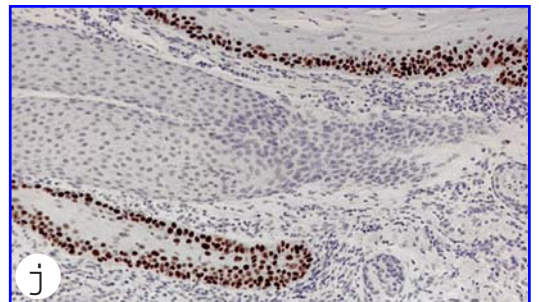
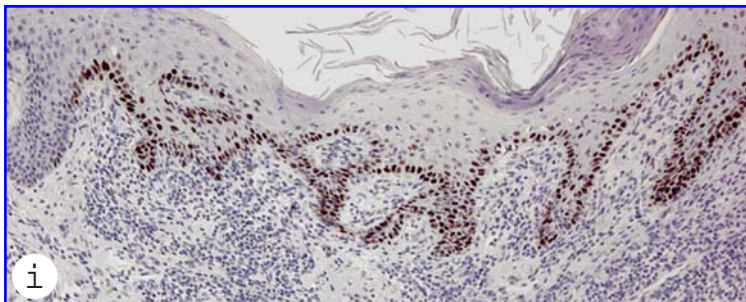
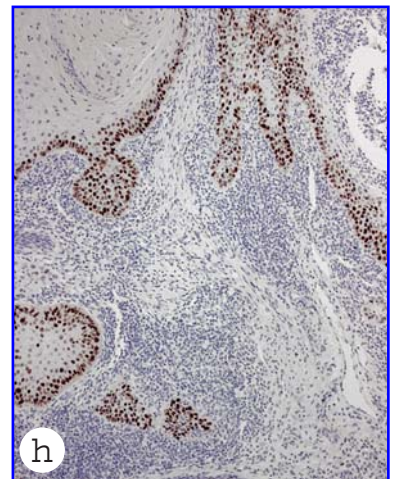
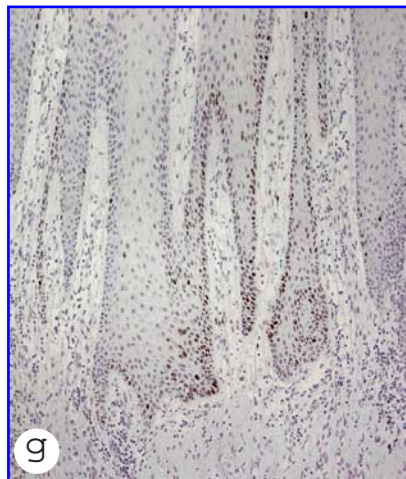
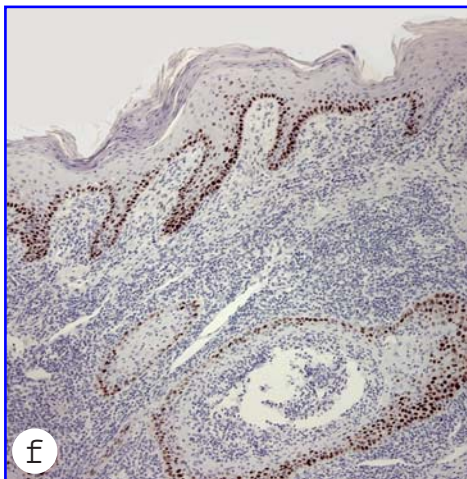
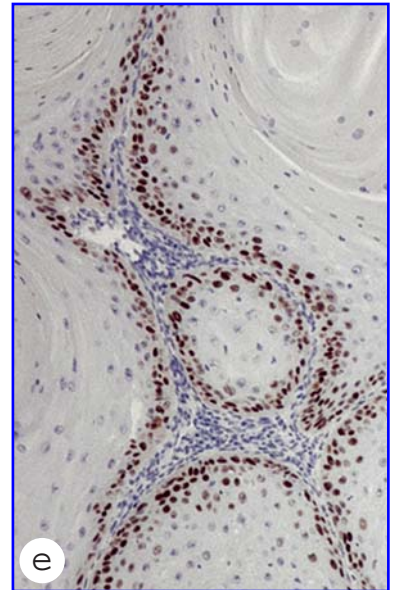
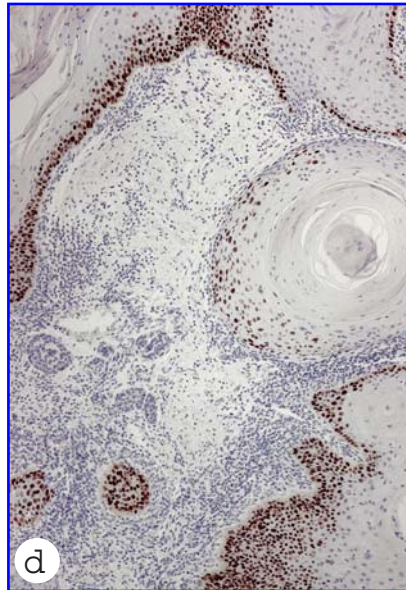
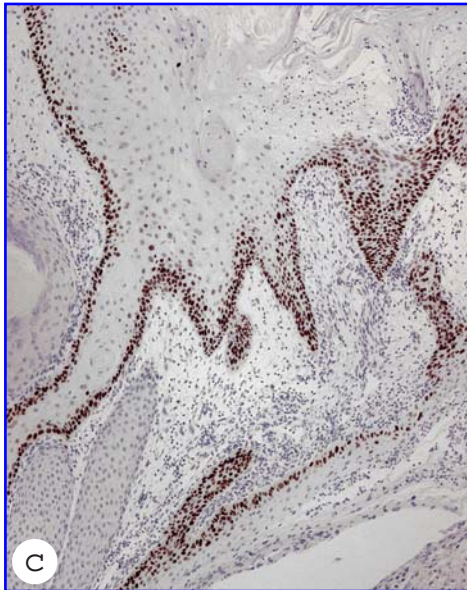
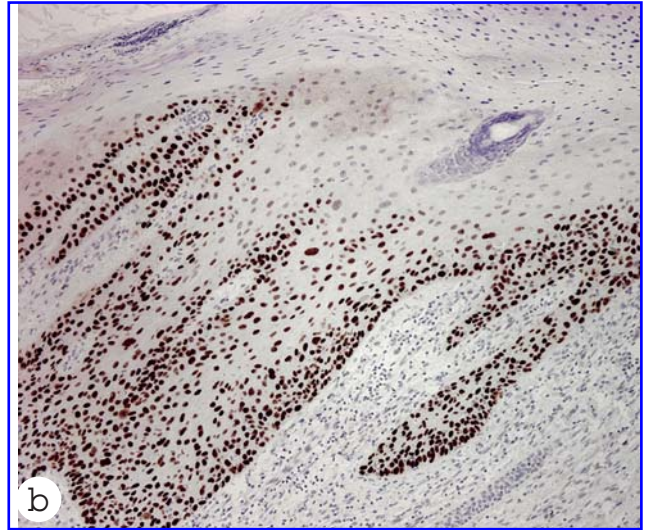
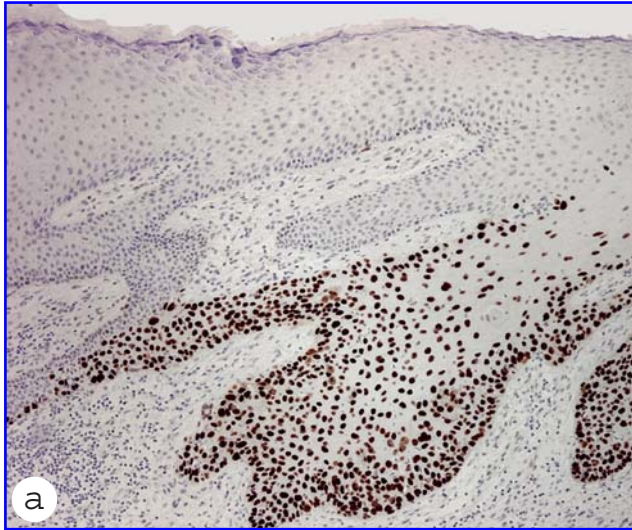


Figura 4. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - P53

- a. Se observa una epidermis normal y un carcinoma intradérmico pobremente diferenciado, con una intensa proliferación celular, en la que destaca la positividad de la expresión nuclear de p53. En los márgenes del nido tumoral existe infiltración de linfocitos.
- b. La epidermis presenta una hiperplasia y displasia de células parabasales p53 positivas. En el nido tumoral, la mayoría de las células malignas tiene una positividad muy marcada de p53, con áreas de necrobiosis periférica. **Inset:** Existe un evidente pleomorfismo nuclear, con intenso marcaje de p53 en todo el nucleoplasma.
- c. Infiltración difusa de células tumorales desdiferenciadas, con alto índice de positividad para p53; sin embargo, la expresión de este oncogén en la zona inferior, moderadamente diferenciada, es significativamente inferior.
- d. Detalle del caso anterior, con alto índice de P53 en las células tumorales. Nótese la presencia de células malignas p53 negativas.
- e. Carcinoma desdiferenciado con células pleomórficas, algunas gigante-multinucleadas, con intenso inmunomarcaje de p53.
- f. Todas las células tumorales son p53 positivas, destacando en el centro una célula poliploide, de núcleo de gran tamaño, con robusta expresión de p53 en el nucleoplasma.
- g. Células malignas desdiferenciadas con núcleos pleomórficos y escaso citoplasma. El tumor se extiende en un crecimiento difuso en todo el campo. El índice de p53 es superior al 90% de las células tumorales.
- h. Tumor desdiferenciado en el que los núcleos pleomórficos son siempre positivos para la proteína p53.

Carcinoma Epidermoide Pobrememente Diferenciado

p53

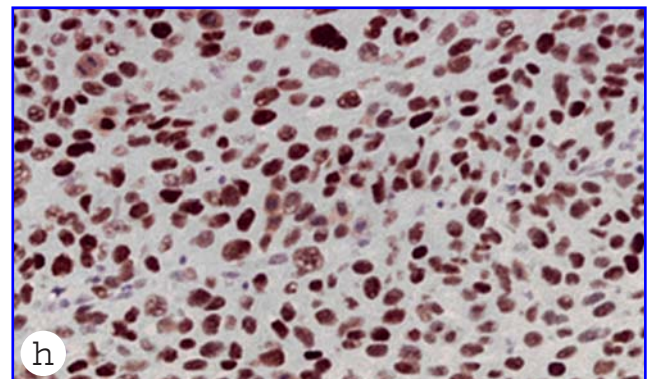
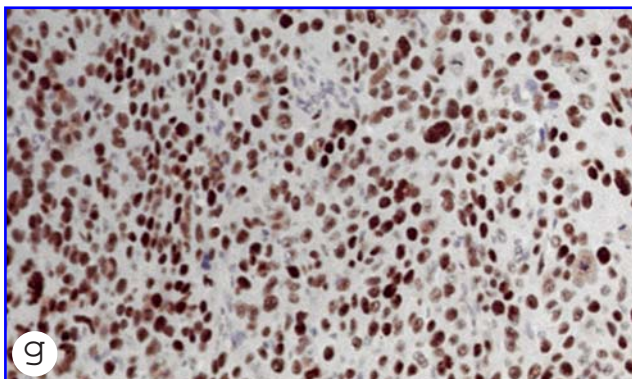
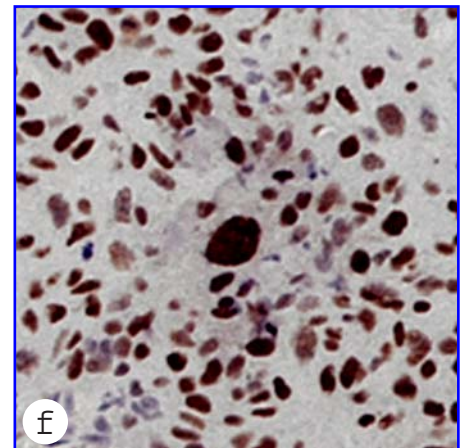
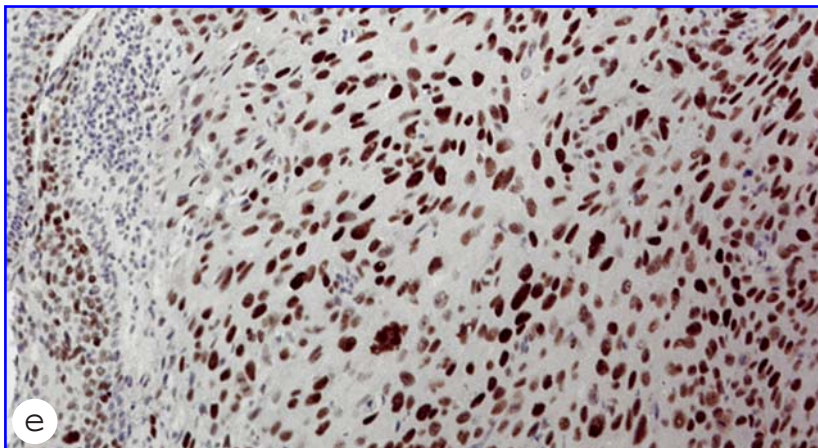
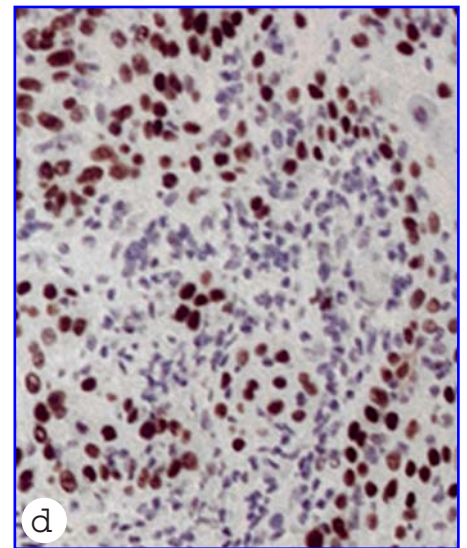
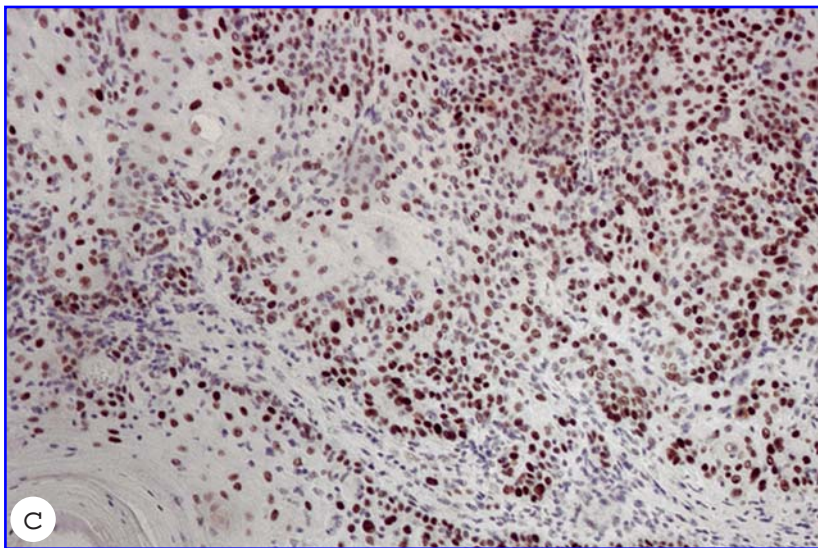
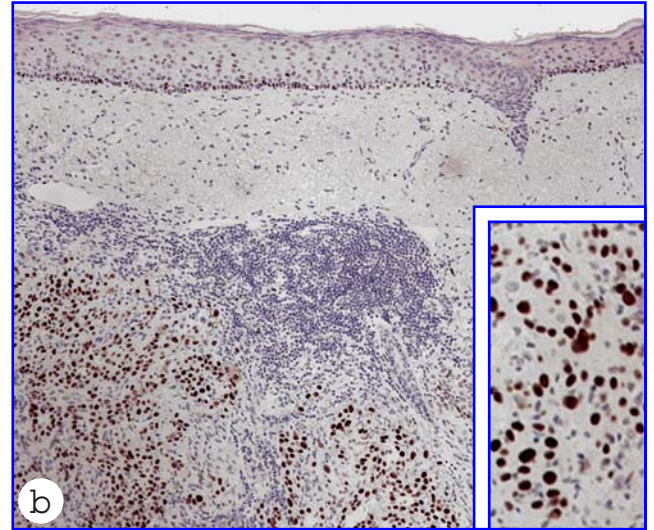
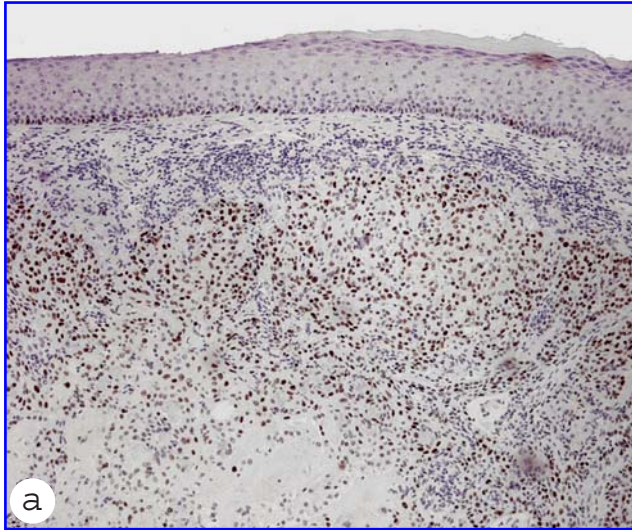


Figura 5. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Aurora A

- a. Interfase entre una hiperplasia epidérmica y un CE bien diferenciado intraepidérmico, que penetra en el dermis adyacente. La expresión de Aurora A fundamentalmente ocurre en el núcleo de las células basales y suprabasales; mientras que, los queratinocitos con diferenciación escamosa son negativos.
- b. Área infiltrante de CE, con moderado índice de positividad intranuclear de Aurora A en las células basales y en las células suprabasales.
- c. Sección transversal de yemas tumorales de un carcinoma verrucoso que penetra en el dermis profundo. La expresión de Aurora A es baja pero siempre positiva en las células basales. Las glándulas sudoríparas normales expresan Aurora A en los núcleos de las células secretoras.
- d. Carcinoma intraepitelial bien diferenciado, con intensa expresión intranuclear de Aurora A y mínima expresión intracitoplasmática. En las zonas de máxima proliferación, la mayoría de las células basales y suprabasales expresan este epítipo.
- e. CE infiltrante en el dermis superficial, con intensa respuesta inflamatoria. Aurora A se expresa intensamente en la mayoría de las células basales de los nidos tumorales con diferenciación escamosa, aunque está ausente en las células malignas queratinizadas.
- f. Detalle del caso anterior que muestra células malignas moderadamente diferenciadas, las cuales siempre expresan un intenso marcaje nuclear de Aurora A.
- g. En las zonas de hiperplasia epidérmica, además de las células basales Aurora A positivas, algunas células suprabasales y algunos queratinocitos escamosos con evidente expresión intranuclear de esta proteína. En el dermis, la masa tumoral principal infiltrante está formada por células de carcinoma escamoso, cuyos núcleos contienen Aurora A.
- h. Área infiltrante de un CE con formación de globos córneos. Nótese la ausencia o mínima expresión de Aurora A en las células tumorales escamosas bien diferenciadas, cuando se comparan con la intensa positividad de las células basales tumorales.
- i. CE de patrón papilar con abundante queratinización. La mayoría de los queratinocitos basales, parabasales y escamosos malignos tienen núcleos Aurora A positivos.
- j. Carcinoma intraepitelial y CE infiltrante bien diferenciado, con inmunomarcaje de Aurora A en la mayoría de las células neoplásicas, aunque destacan células escamosas malignas negativas con este anticuerpo.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

Aurora A

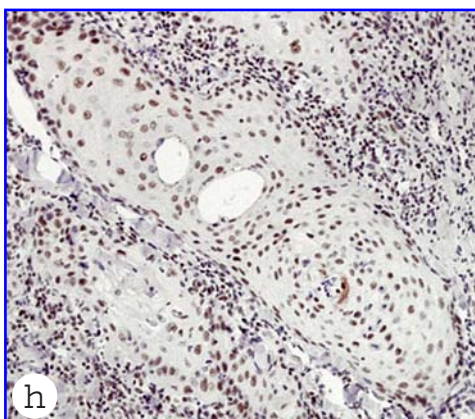
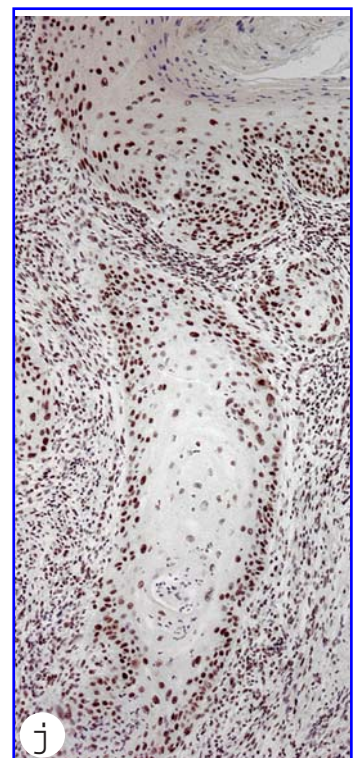
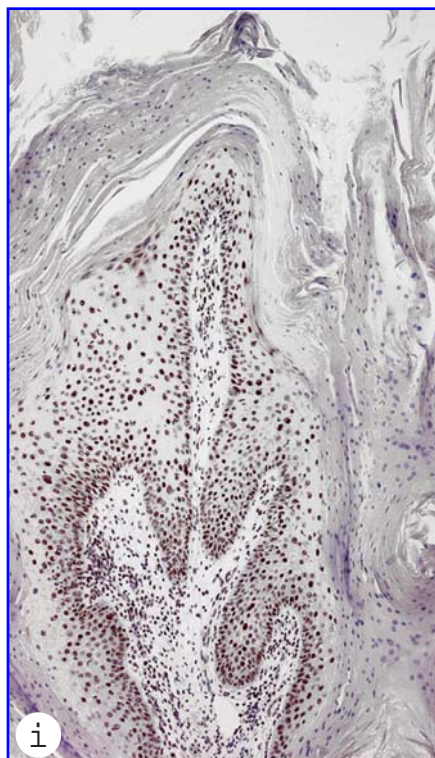
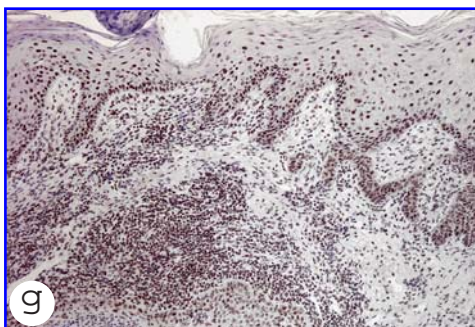
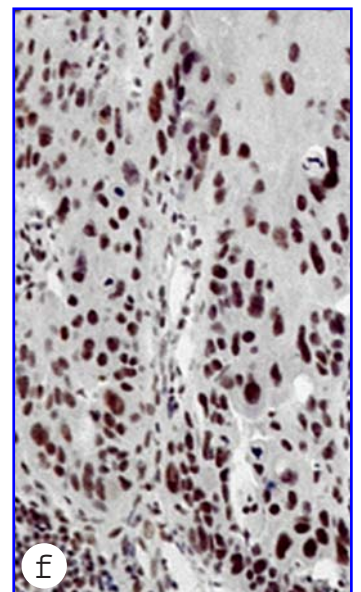
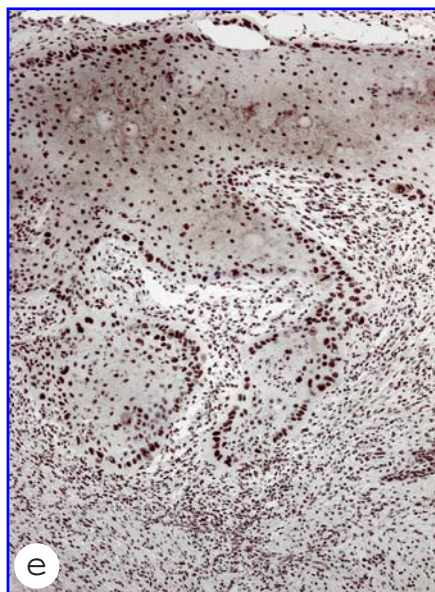
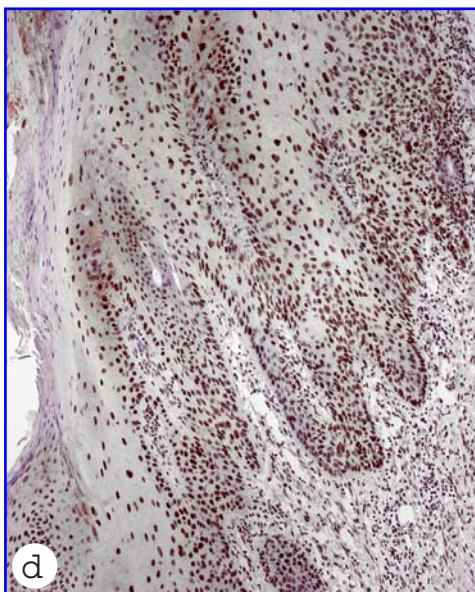
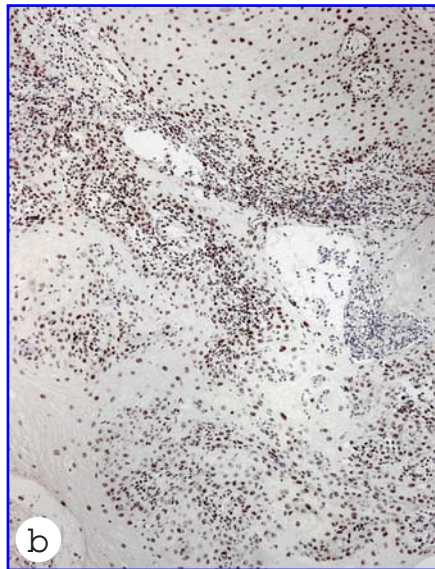
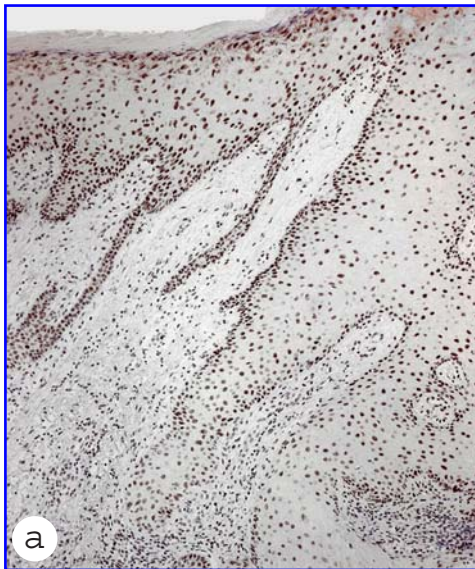


Figura 6. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente diferenciado - Aurora A

- a. Interfase entre el carcinoma intraepitelial y el CE bien diferenciado infiltrante. La mayoría de las células hiperplásicas y neoplásicas presentan expresión de Aurora A intranuclear. Las células queratinizadas son negativas; pero los abundantes linfocitos, localizados en el dermis papilar y reticular tienen inmunomarcaje intranuclear de Aurora A. **Inset:** Células malignas queratinizadas, cuyos núcleos expresan Aurora A.
- b. Gran masa tumoral, con amplias áreas de necrosis e infiltrados inflamatorios. La mayoría de las células malignas y de los linfocitos tienen inmunomarcaje nuclear de Aurora A. La epidermis que cubre el tumor es de grosor normal, pero contiene células displásicas en el estrato suprabasal y escamoso con tinción nuclear para Aurora A.
- c. La mayoría de los núcleos de las células malignas desdiferenciadas son Auroras A positivas; sin embargo, en el citoplasma de estas células, la expresión de este epítipo está ausente o es mínima.
- d. El CE indiferenciado infiltra la interfase dérmico-subdérmica, a nivel donde se encuentran espiremas de las glándulas sudoríparas. La expresión intranuclear de Aurora A es constante en las células neoplásicas y también es netamente positiva en los núcleos de las células secretoras sudoríparas.
- e. Carcinoma completamente indiferenciado con alto índice de positividad de Aurora A.
- f. Detalle del caso anterior con células tumorales pleomórficas Aurora A positivas. También se ven algunas células malignas y células apoptóticas con y sin inmunomarcaje.
- g. Masa tumoral con una elevada expresión intranuclear de Aurora A. Se aprecian células malignas desdiferenciadas con grandes núcleos y de diferentes tamaños.
- h. El CE pobremente diferenciado presenta células con una gran positividad de expresión intranuclear de Aurora A. En la periferia del carcinoma se ve un infiltrado linfocitario con alta positividad de Aurora A. **Inset:** Detalle del caso anterior, en el que el pleomorfismo de las células tumorales es muy evidente y además los núcleos son intensamente positivos para Aurora A; contrariamente, el citoplasma de las células malignas es completamente negativo.

Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado

Aurora A

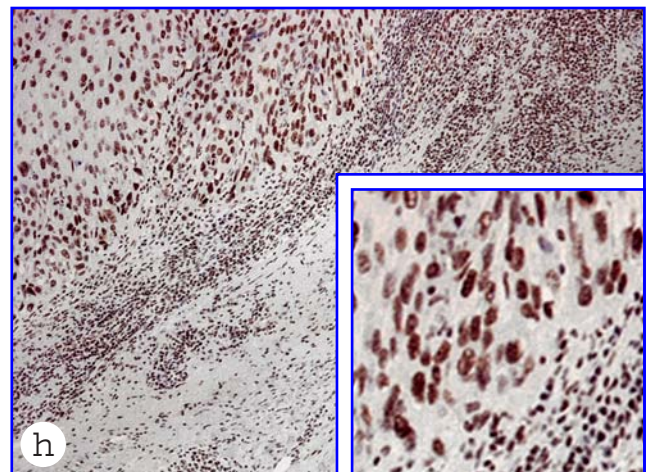
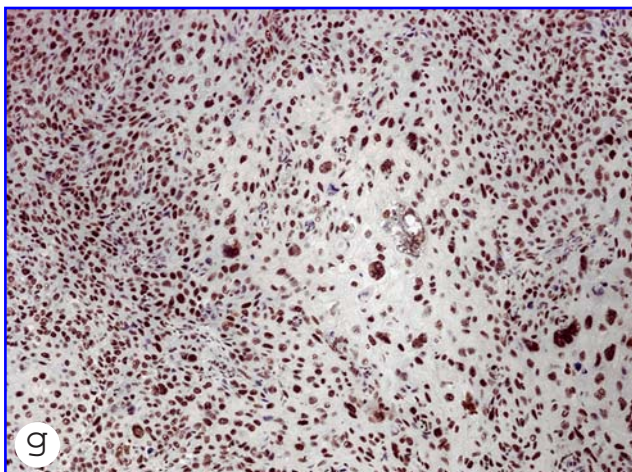
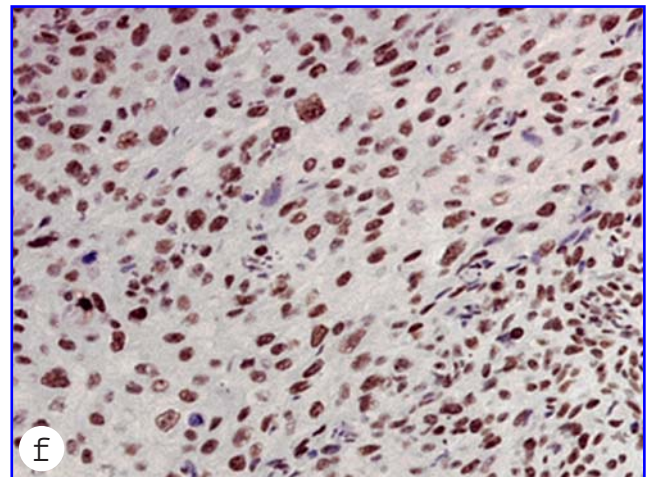
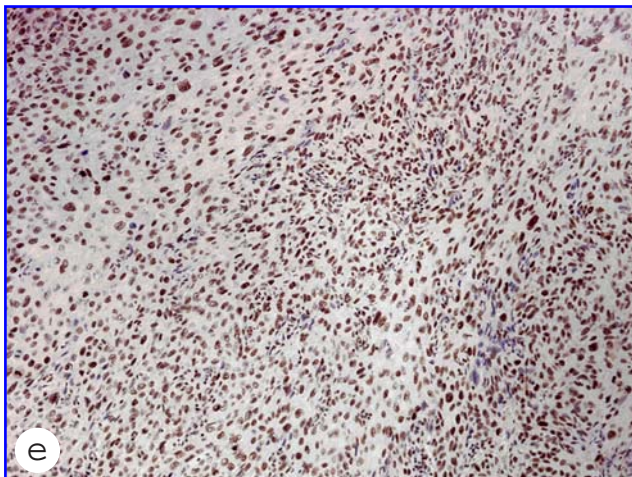
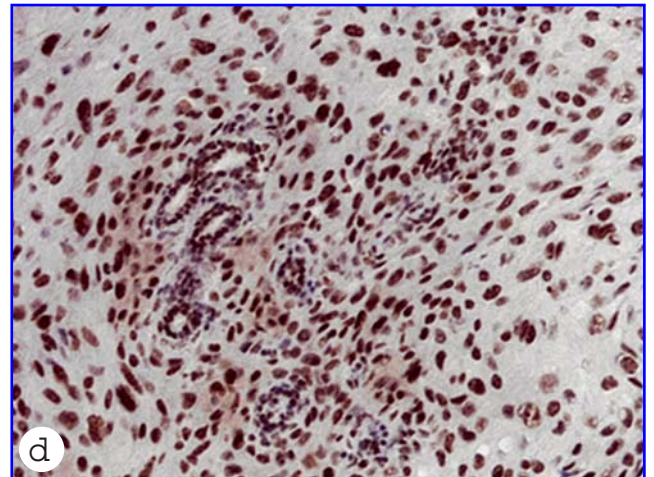
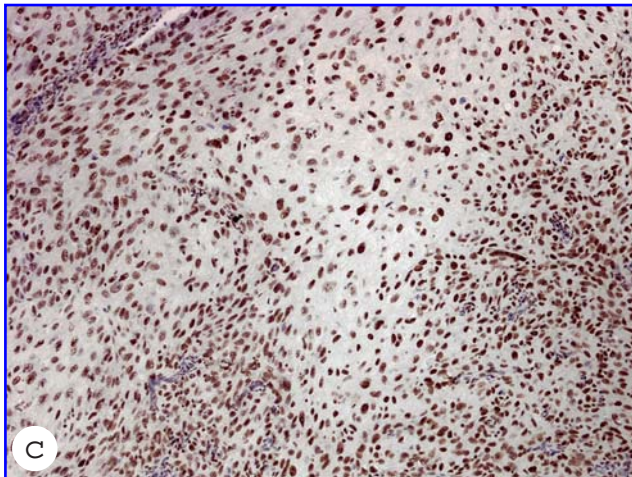
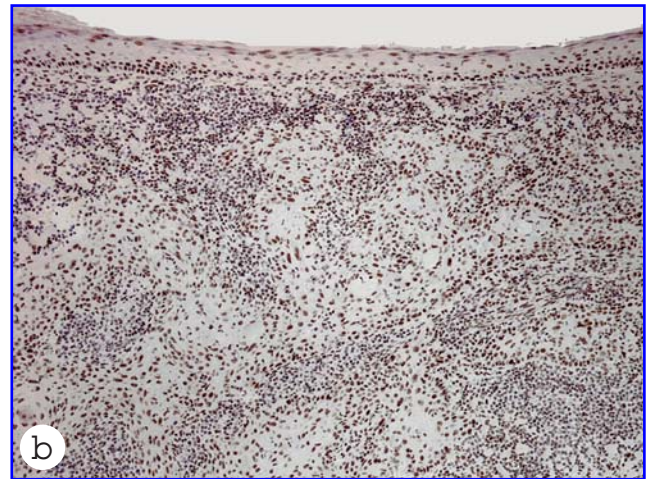
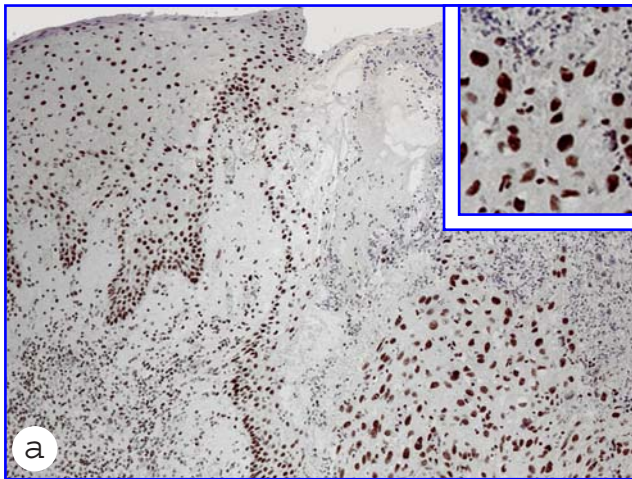


Figura 7. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Aurora B

- a. Expresión intranuclear de Aurora B en algunos queratinocitos basales y suprabasales.
- b. Se observa un moderado aumento del número de núcleos positivos en las células suprabasales epidérmicas, en relación con infiltrados linfocitarios del dermis adyacente. **Inset:** la intensidad del inmunomarcaje es mayor en las células basales que en las suprabasales.
- c. Lesión inicial de displasia epitelial asociada a un incremento significativo del número de núcleos Aurora B positivos.
- d. El límite dermoepidérmico es irregular y existen abundantes linfocitos en el dermis papilar. La epidermis contiene células disqueratósicas, con aumento de la expresión de Aurora B.
- e. Área focal de CE con invasión de la porción superficial del dermis. Nótese el evidente incremento de núcleos Aurora B positivos.
- f. CE caracterizado por múltiples yemas que penetran y empujan el dermis adyacente. La mayoría de las células basales tumorales son Aurora B positivas. La epidermis adyacente al tumor muestra áreas de hiperplasia con incremento de células basales y suprabasales inmunomarcadas.
- g. CE infiltrante en el que la mayor actividad de Aurora B se encuentra en las zonas basales y suprabasales tumorales. En la zona central de la imagen se observan células malignas más desdiferenciadas con incremento del número de núcleos inmunomarcados.
- h. En la porción superior se observa una epidermis hiperplásica con algunas células basales inmuneñidas. Subyacentemente el carcinoma empuja al dermis adyacente y aproximadamente la mitad de sus células expresan Aurora B.
- i. Irregular distribución de las células Aurora B positivas en diferentes áreas de un CE infiltrante bien diferenciado.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

Aurora B

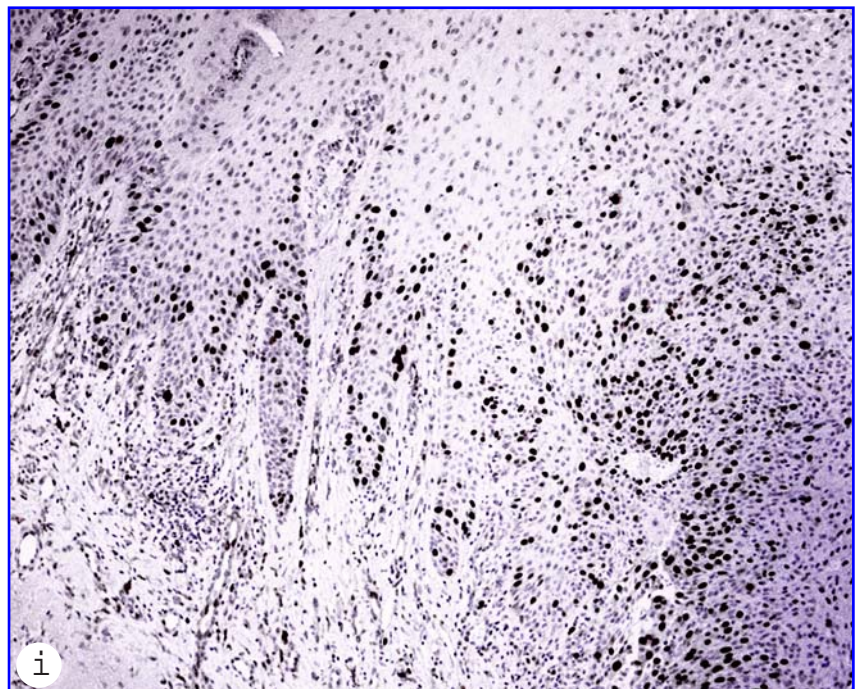
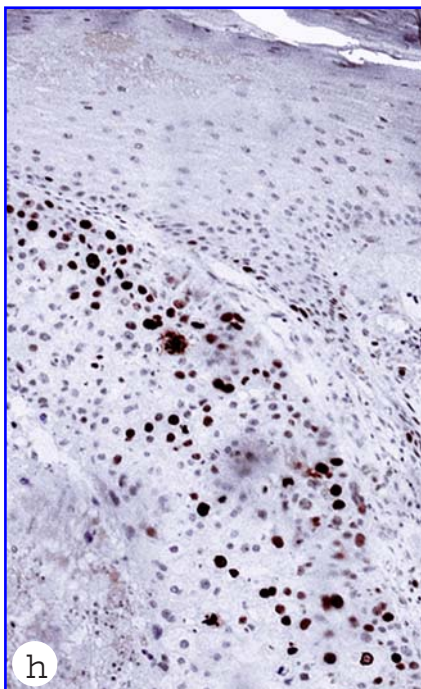
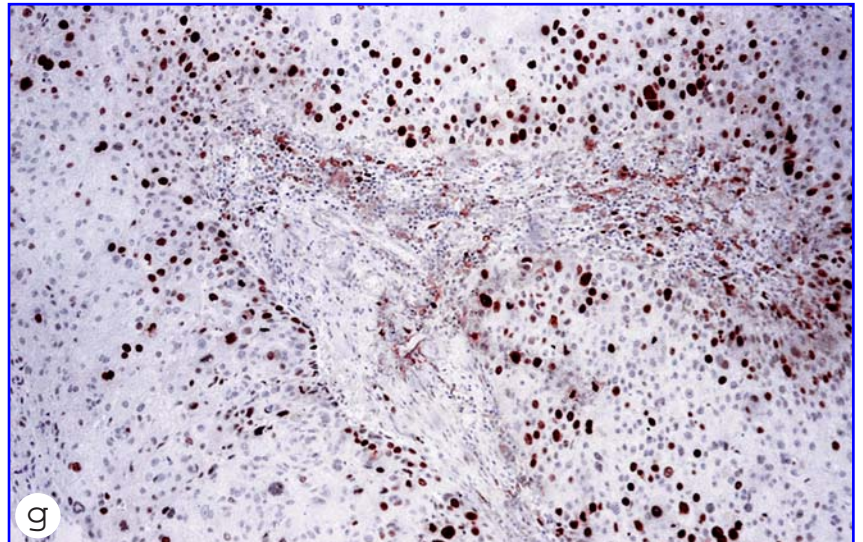
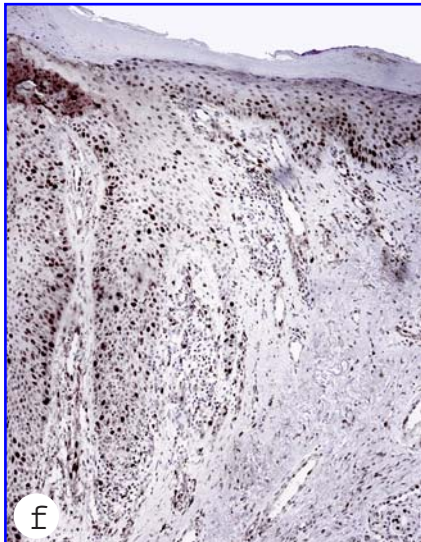
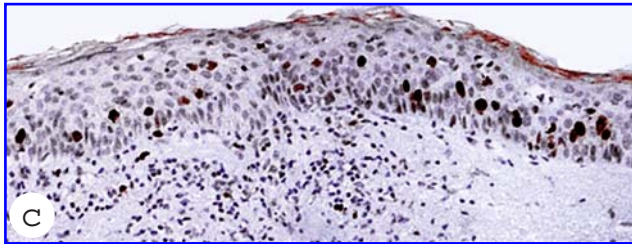
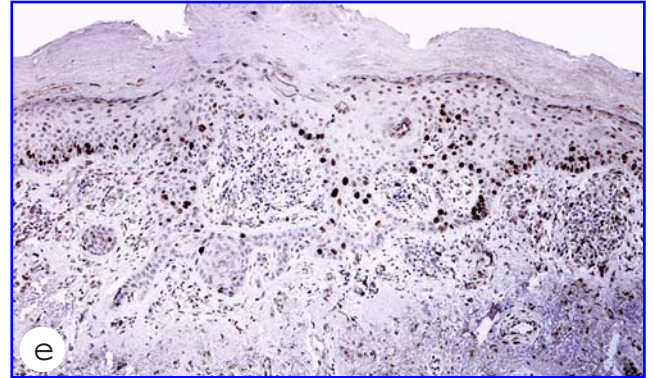
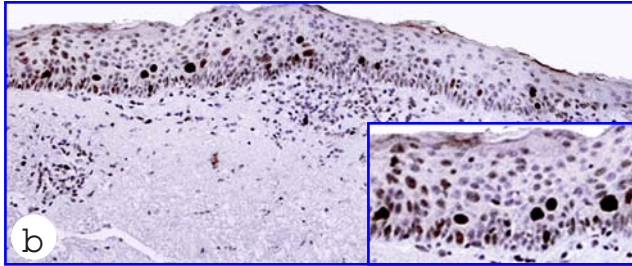
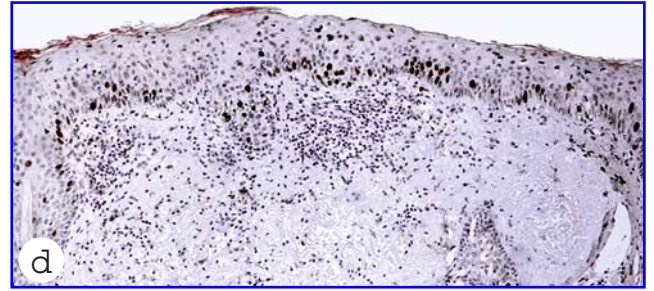
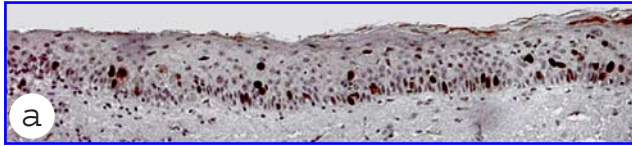


Figura 8. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente diferenciado - Aurora B

- a.** La mayoría de las células del CE infiltrante son desdiferenciadas y tienen un alto índice de marcaje nuclear de Aurora B
- b.** Destaca el alto número de núcleos positivos en las zonas de CE pobremente diferenciado, si se compara con el escaso índice de Aurora B en la zona central con células tumorales bien diferenciadas.
- c.** Infiltración difusa de células de CE pobremente diferenciado con un alto índice de inmunomarcaje nuclear de Aurora B. El tumor desencadena una importante respuesta de células inmunocompetentes.
- d.** Crecimiento difuso de células escamosas desdiferenciadas con un alto índice Aurora B positivo. Destacan algunas células disqueratóticas con núcleo de gran tamaño y robusta inmunotinción.
- e.** CE de alto grado en el que la mayoría de células tumorales son Aurora B positivas. Existen áreas de necrosis y otras de reacción desmoplásica con infiltrados inflamatorios que carecen de inmunotinción.
- f.** Crecimiento difuso de un CE pobremente diferenciado en el que prácticamente todas las células tumorales tienen intenso inmunomarcaje de Aurora B.

Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado

Aurora B

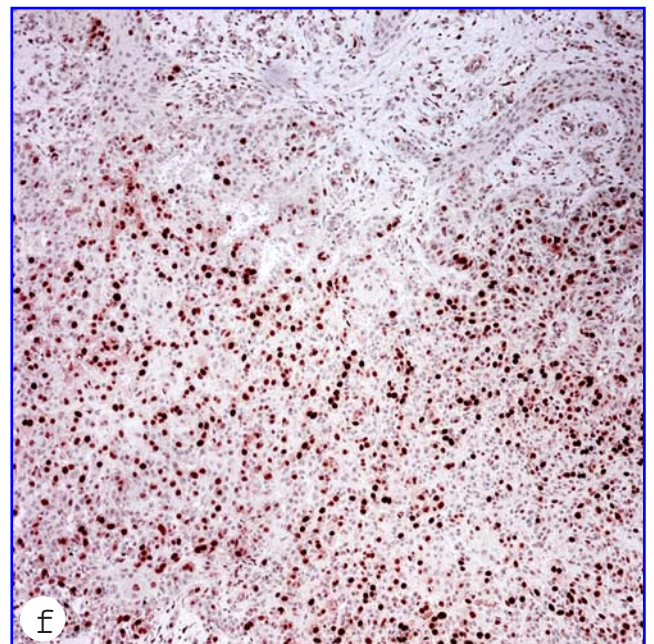
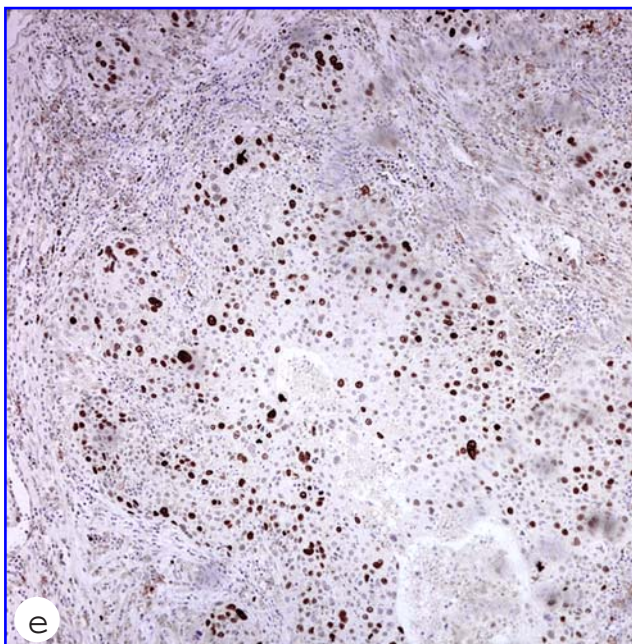
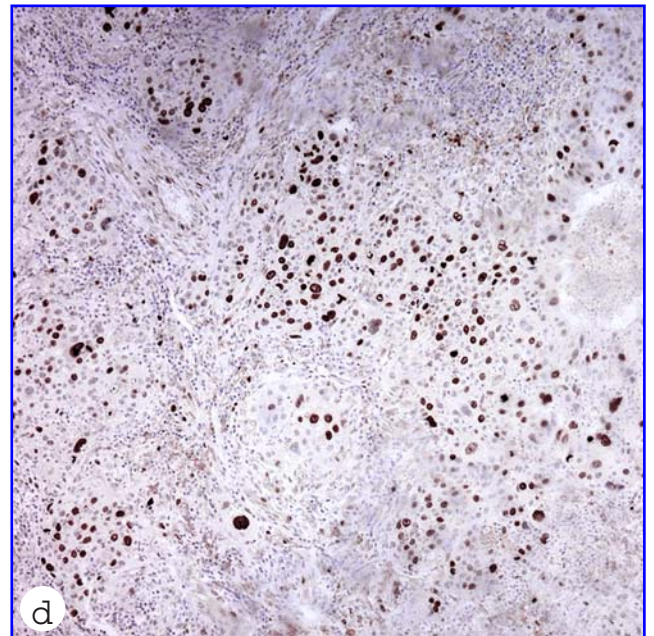
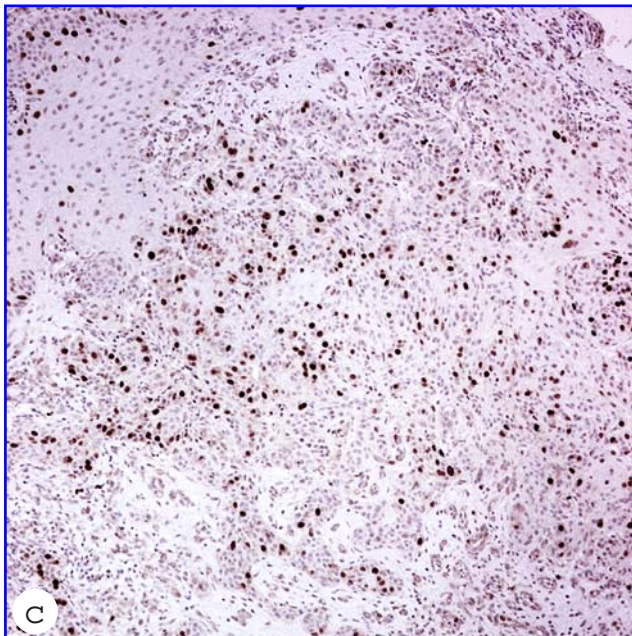
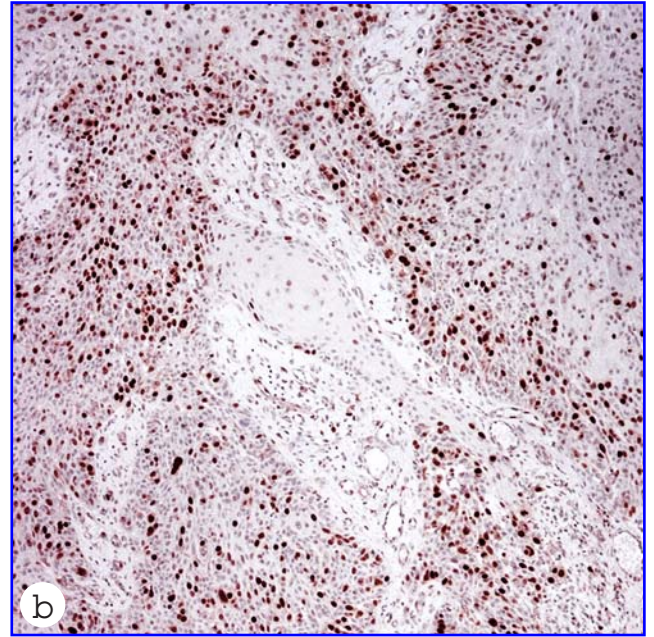
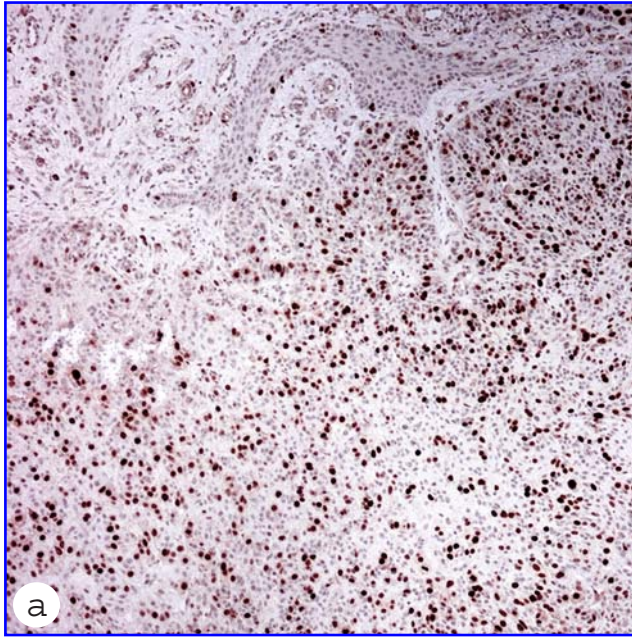


Figura 9. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Survivina

- a. Carcinoma intraepitelial con yemas tumorales pseudoinfiltrantes. Las células basales tienen una constante e intensa expresión de Survivina, siendo menor o ausente en las células escamosas. El marcaje de Survivina en todos los queratinocitos neoplásicos es constante en su citoplasma, pero la intensidad de tinción es notoriamente inferior a la de los núcleos neoplásicos. **Inset:** células malignas cuyo nucleoplasma está ocupado por inmunorreacción de Survivina.
- b. Neoplasia intraepitelial maligna y CE bien diferenciado, infiltrante en el dermis y con abundante formación de globos córneos. El índice de núcleos Survivina positivos es bajo, pero la inmunoexpresión del citoplasma de los queratinocitos escamosos bien diferenciados y de las láminas cornificadas es intensa.
- c. La neoplasia intraepidérmica maligna penetra empujando el dermis adyacente. Se ven núcleos tumorales Survivina positivos y otros negativos.
- d. Detalle del caso anterior. Se aprecia intenso marcaje de Survivina en el citoplasma de las células escamosas malignas; los núcleos Survivina positivos son más abundantes en el epitelio basal.
- e. Múltiples globos córneos asociados a extensa respuesta inflamatoria en un CE infiltrante bien diferenciado. La tinción citoplasmática de Survivina es muy intensa, pero el número de núcleos inmunomarcados no es muy alto.
- f. CE bien diferenciado, originado en la epidermis y que crece con un patrón de tipo verrucoso, protruyendo hacia el dermis. El número de núcleos Survivina positivos es bajo.
- g. Las yemas de carcinoma verrucoso penetran en la profundidad del dermis y alcanzan la vecindad de espiremas ecrinos. La tinción de Survivina intracitoplasmática es moderada y el marcaje nuclear es heterogéneo, alternando núcleos intensamente positivos con otros negativos.
- h. Globos córneos grandes y muy irregulares, delimitados por células malignas de CE, que muestra una variable expresión de Survivina.
- i. Transformación microquística de globos córneos que están delimitados por células escamosas de CE bien diferenciado, cuyos núcleos y citoplasmas presentan una intensa inmunoexpresión de Survivina.
- j. Destaca la positividad de Survivina intranuclear en todas las células malignas. A medida que se incrementan los procesos de queratinización en las células tumorales, se evidencia una progresiva expresión de Survivina en el citoplasma, alcanzándose la máxima intensidad en las láminas citoplásmicas cornificadas.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

Survivina

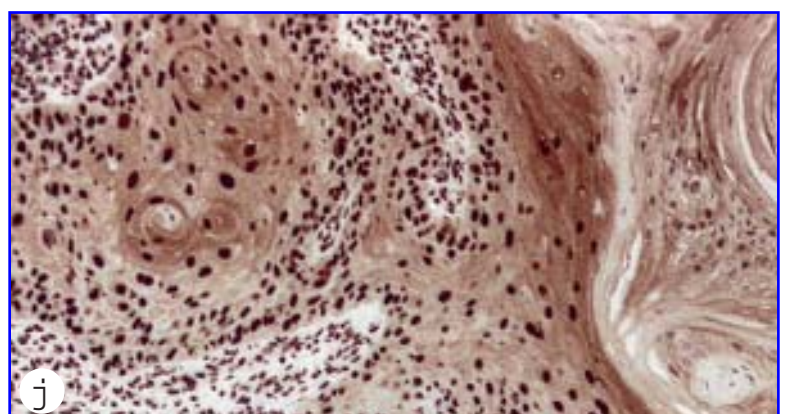
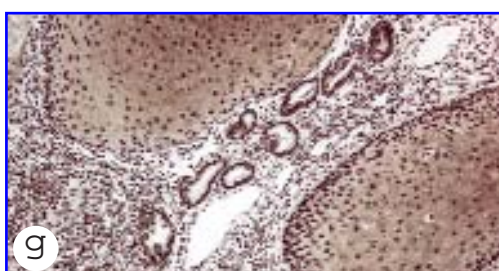
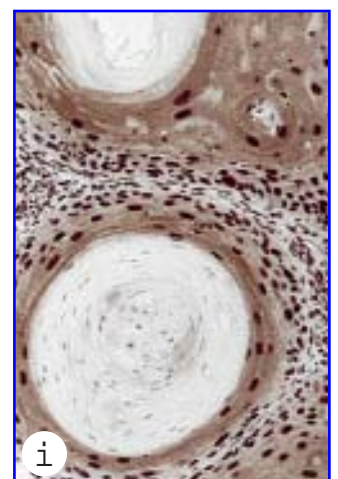
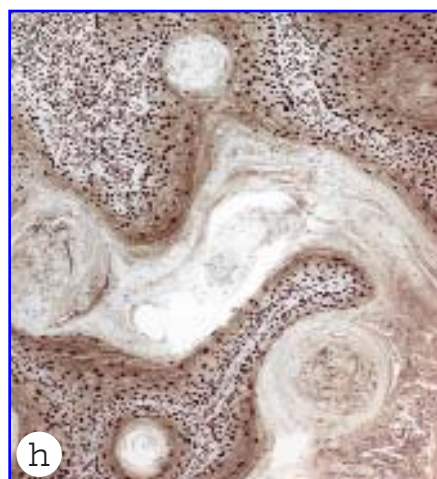
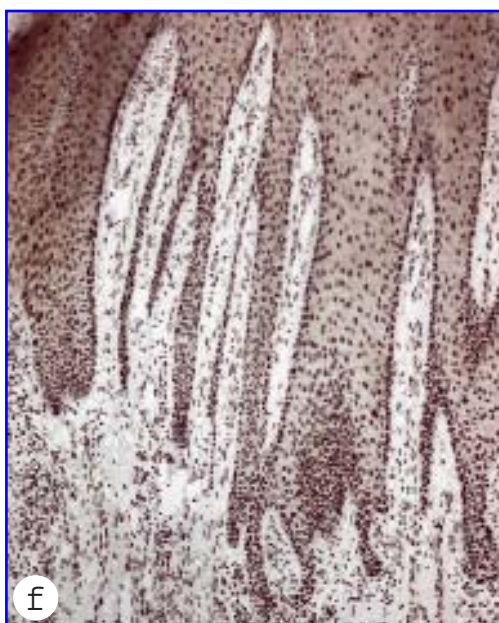
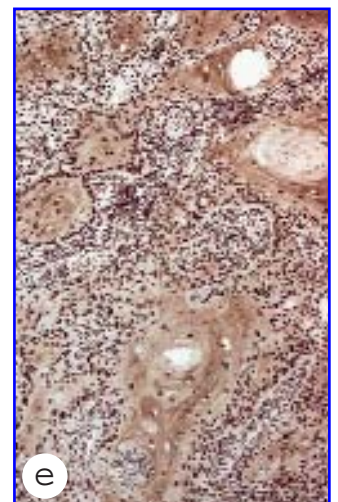
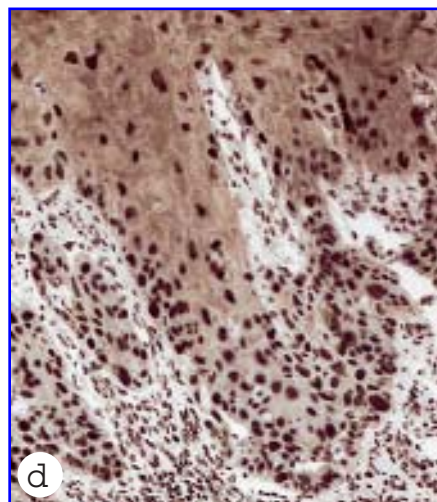
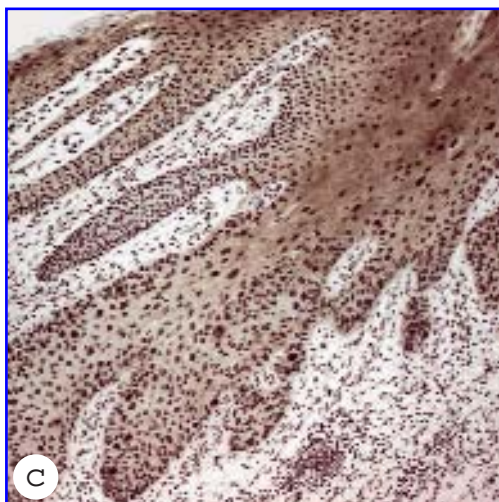
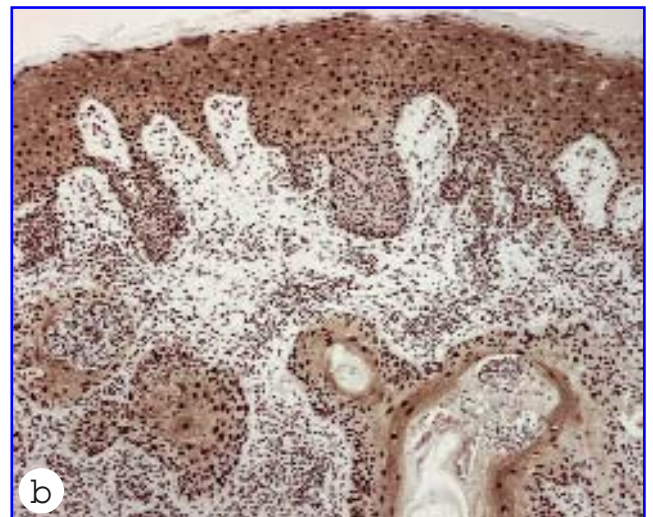
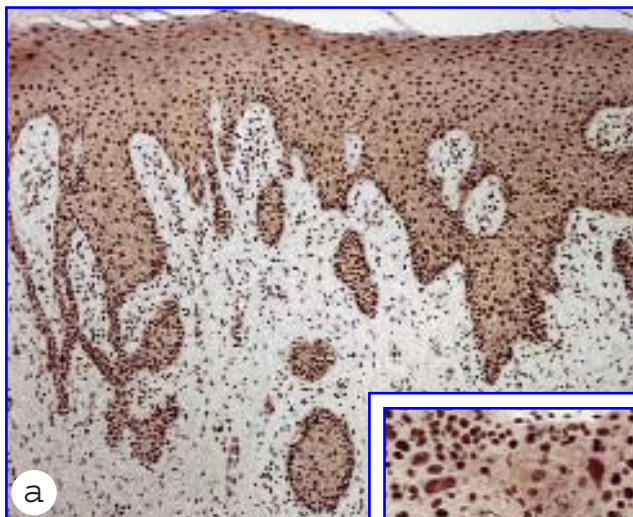


Figura 10. Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado - Survivina

- a. Tumor intraepitelial e infiltrante en el dermis papilar con intenso pleomorfismo celular. La expresión de Survivina es citoplásmica e intranuclear.
- b. La epidermis presenta células displásicas con intensa expresión citoplasmática de Survivina. Algunos núcleos son positivos. En el dermis existe un tumor infiltrante con áreas indiferenciadas y formación de globos córneos. La intensidad de Survivina es variable.
- c. Carcinoma intraepitelial en la vecindad del tumor ulcerado e infiltrante con intensa expresión de Survivina.
- d. Nódulo tumoral rodeado por un área necrótica. **Inset:** la mayoría de los núcleos son Survivina positiva.
- e. Intenso índice de Survivina nuclear y variable expresión en el citoplasma de células desdiferenciadas.
- f. El tumor infiltrado en el dermis profundo presenta una intensa respuesta linfocitaria. El índice de Survivina es alto pero la expresión citoplasmática es baja.
- g. Los queratinocitos indiferenciados expresan intensa Survivina intranuclear.
- h. Patrón infiltrante difuso de carcinoma indiferenciado en la proximidad del músculo esquelético. Todos los núcleos de células tumorales expresan Survivina.

Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado

Survivina

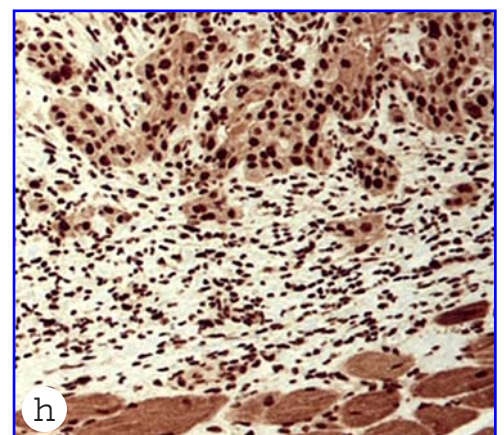
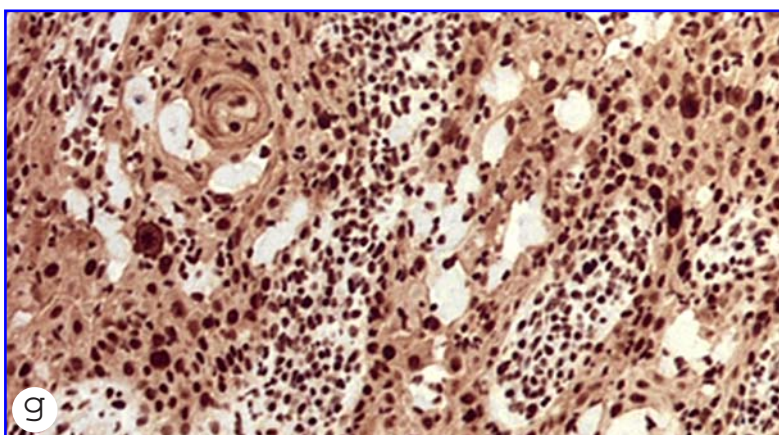
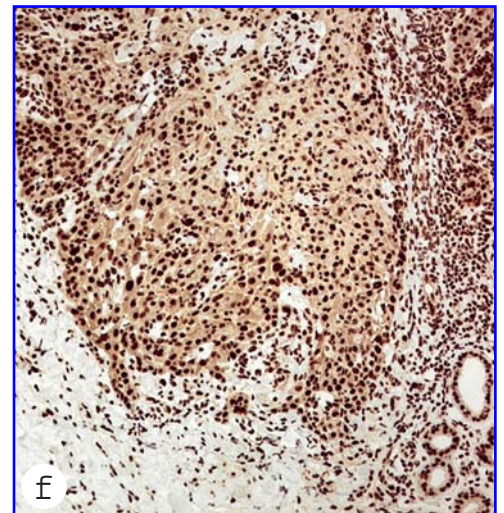
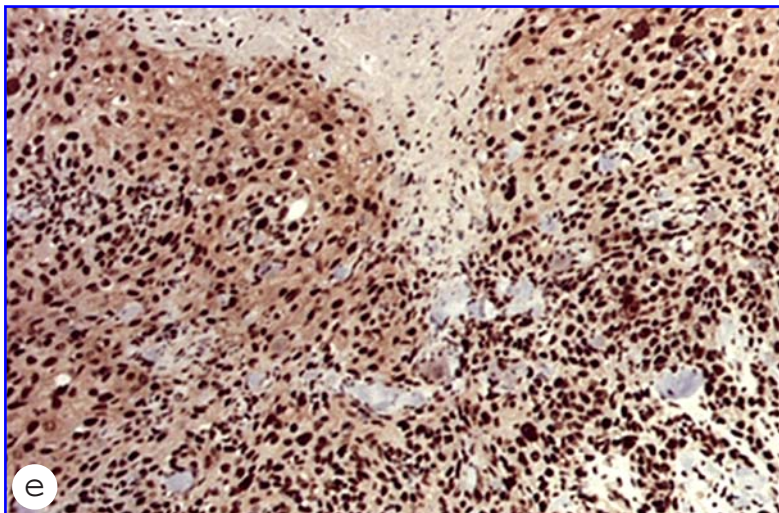
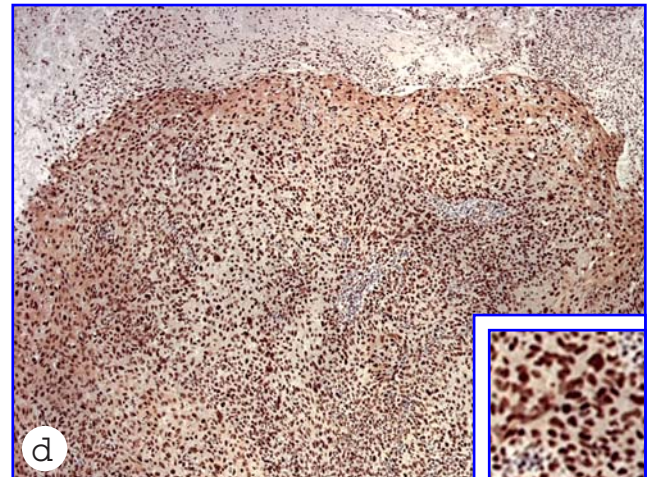
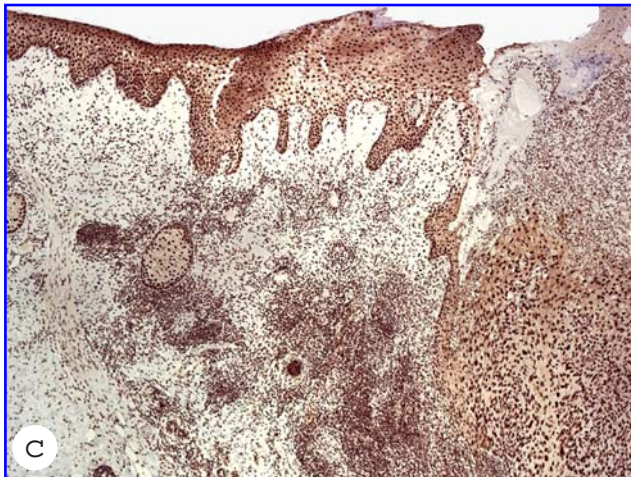
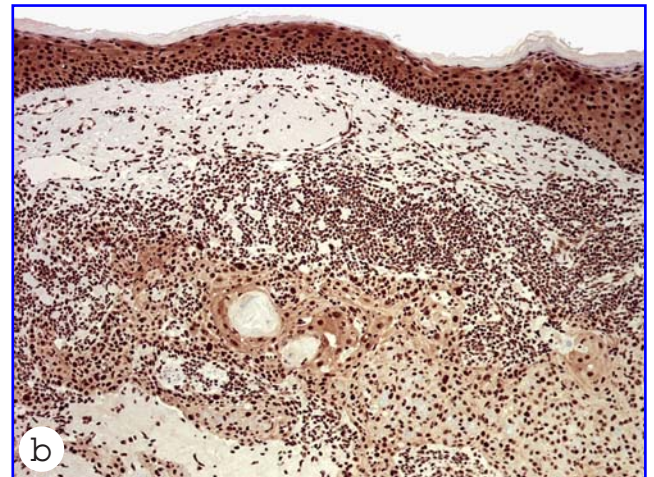
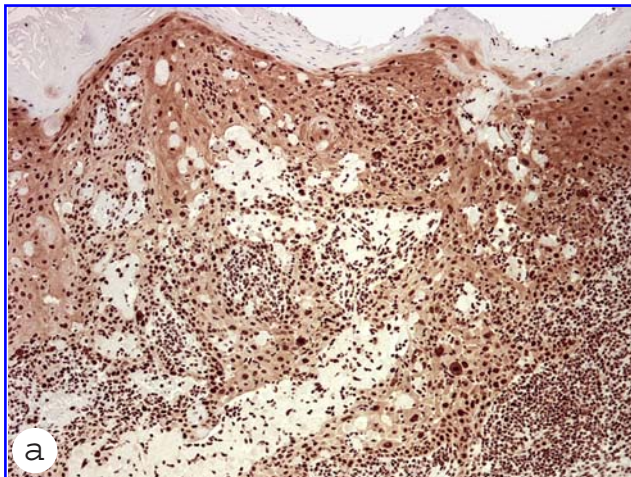


Figura 11. Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado - Fosfosurvivina

- a. Piel normal en la que se observa un tenue marcaje intracitoplásmico de Fosfosurvivina.
- b. Las células basales presentan una discreta expresión nuclear de Fosfosurvivina.
- c. La Fosfosurvivina también se expresa en algunos queratinocitos suprabasales.
- d. En la epidermis se evidencia una pequeña proliferación de queratinocitos basales con tinción nuclear de Fosfosurvivina, la cual también se expresa en el citoplasma de los queratinocitos más superficiales.
- e. Fase inicial de un CE que contiene células neoplásicas disqueratósicas, asociadas a áreas de hiperplasia de células basales. Se ve una zona central infiltrante en el dermis papilar, en la que el número de células Fosfosurvivina positivas es evidentemente mayor.
- f. Borde de un CE con un patrón de infiltración tipo queratoacantoma y ulceración superficial. Destacan numerosas células con expresión nuclear de Fosfosurvivina.
- g. Detalle de otro campo del caso anterior en el que contrasta el alto índice de núcleos inmunomarcados en un área de CE moderadamente diferenciado, frente al bajo índice en la cresta epidérmica tumoral con células bien diferenciadas.
- h. El índice de inmunomarcaje nuclear de Fosfosurvivina es moderado, mientras que en las zonas de queratinización y cornificación el marcaje intracitoplásmico es muy intenso.
- i. La epidermis es normal; subyacentemente existe un CE bien diferenciado con un moderado índice de expresión nuclear de Fosfosurvivina. Algunas células disqueratósicas presentan núcleos pleomórficos con intensa inmunotinción.
- j. Nódulos tumorales de grandes dimensiones con necrosis central. La distribución de núcleos inmunomarcados es irregular en las diferentes áreas del tumor. **Inset:** Todas las células escamosas tumorales tienen marcaje nuclear. Destacan células con núcleos pleomórficos de gran tamaño e intensa expresión de Fosfosurvivina.
- K. CE moderadamente diferenciado en el que la mayoría de las células tumorales tienen tinción nuclear de Fosfosurvivina; la expresión de este epítipo en el citoplasma es escasa, excepto en las células disqueratósicas, las cuales muestran intensa inmunotinción distribuida por todo el citosol.

Carcinoma Epidermoide Bien Diferenciado

Fosfosurvivina

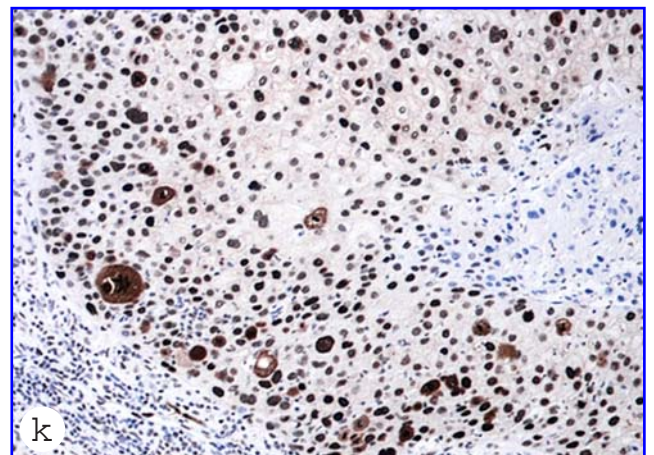
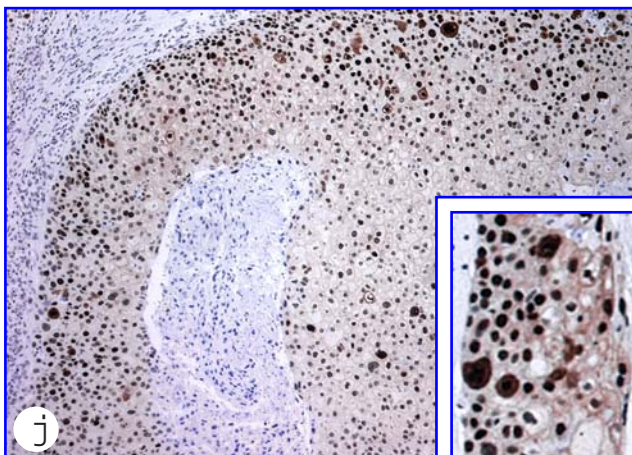
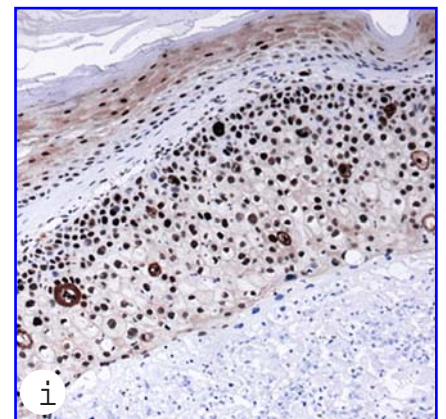
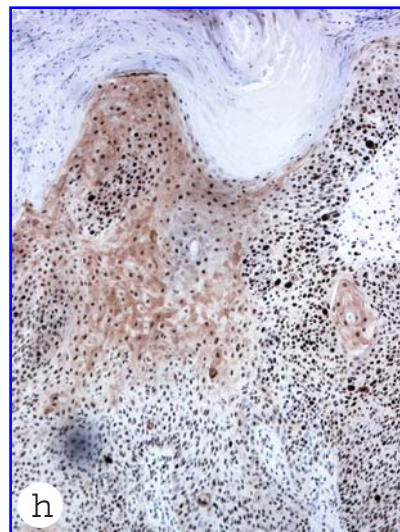
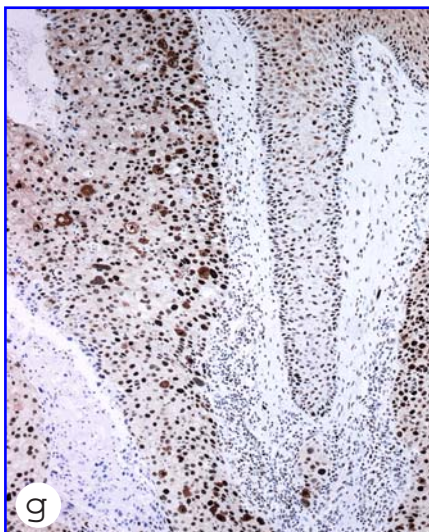
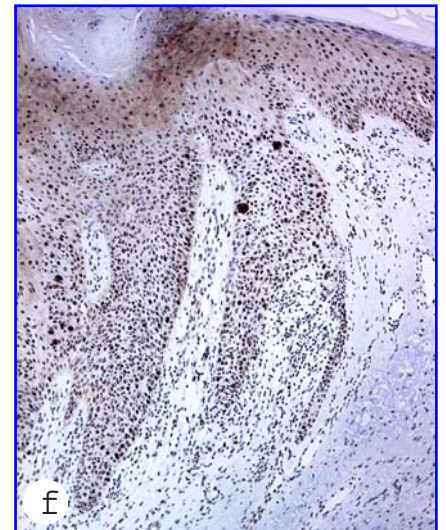
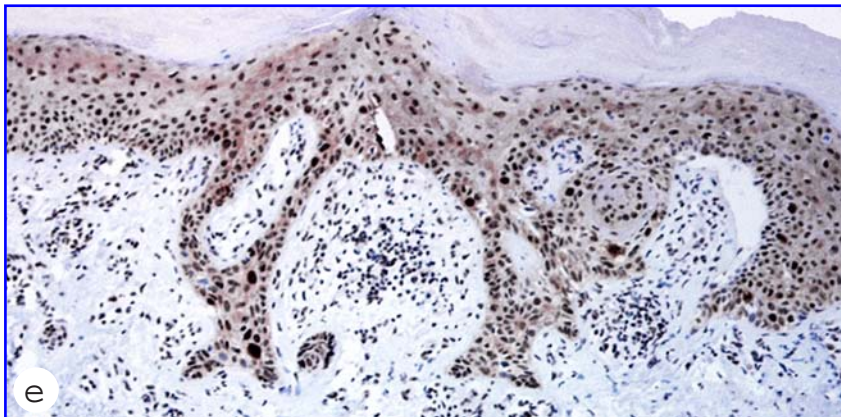
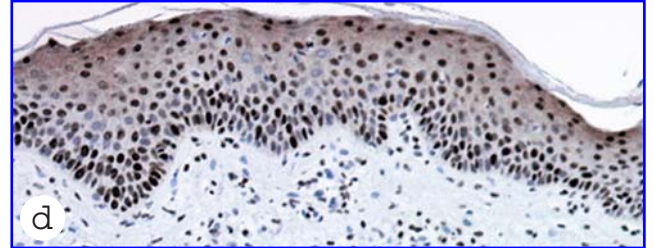
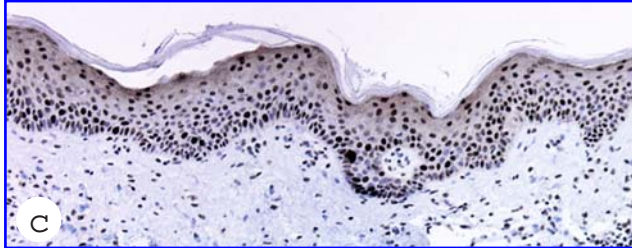
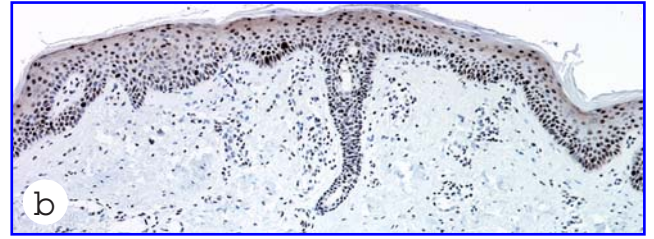
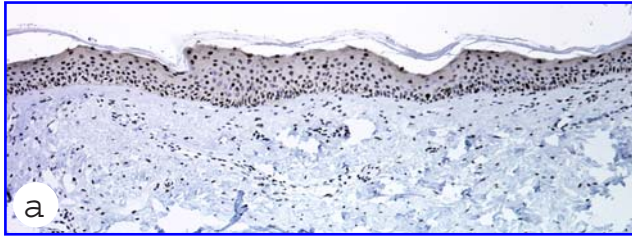
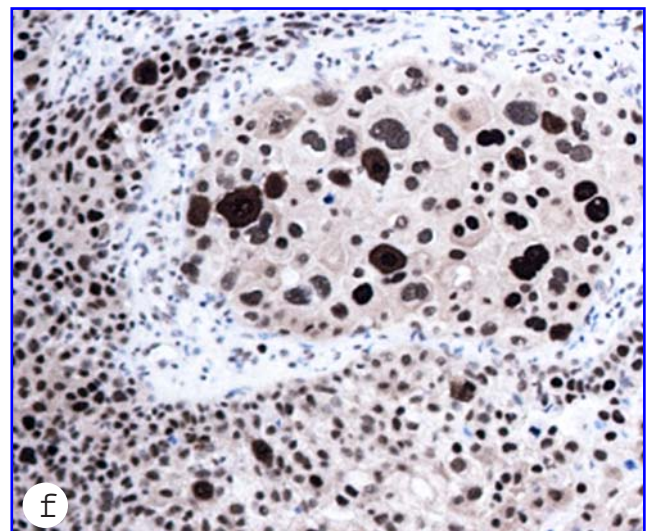
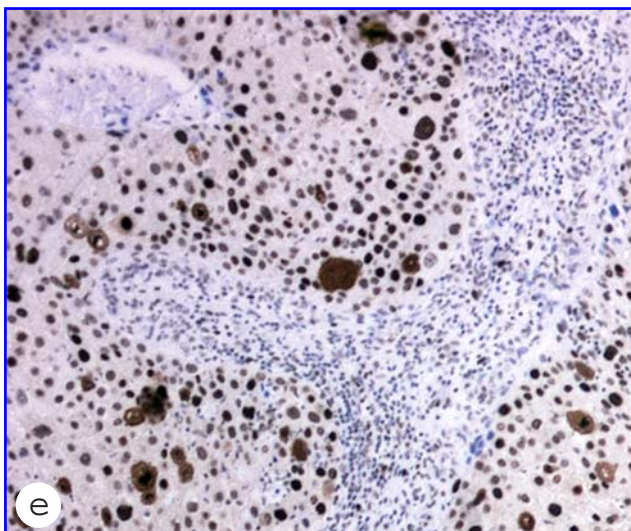
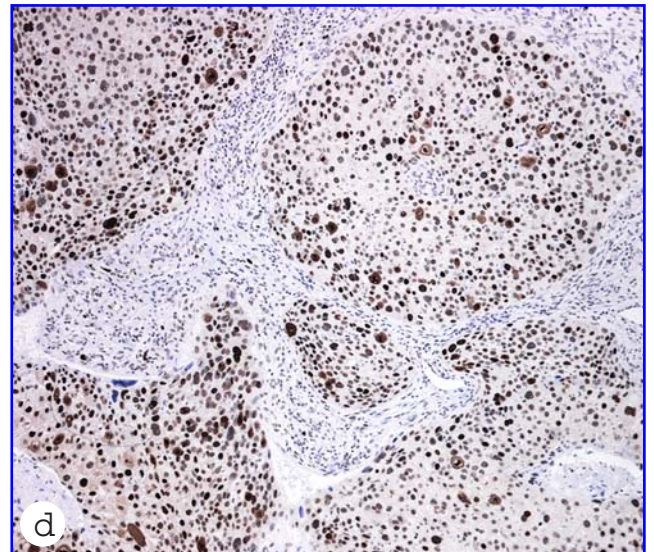
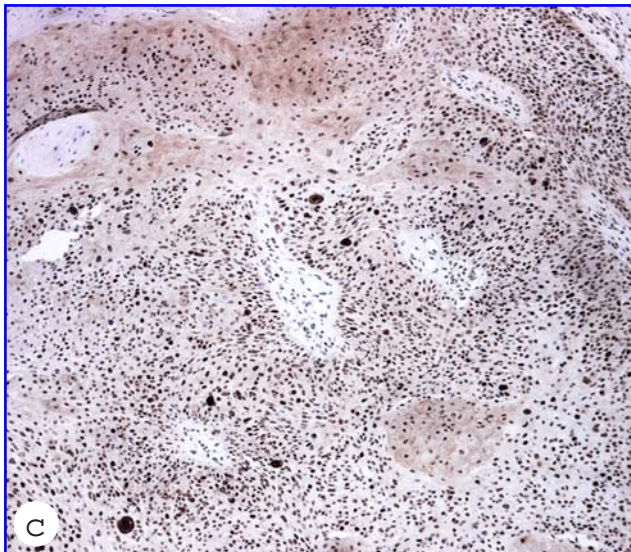
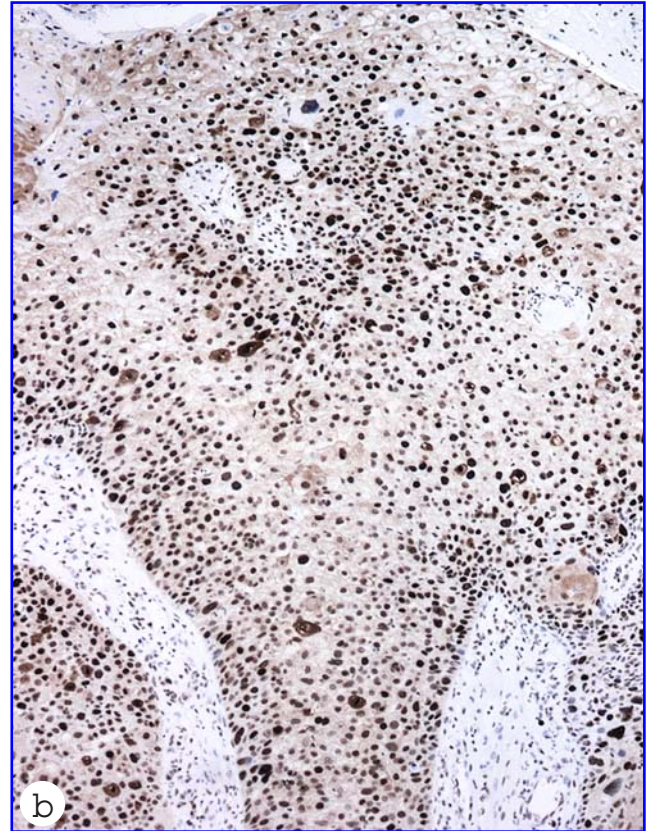
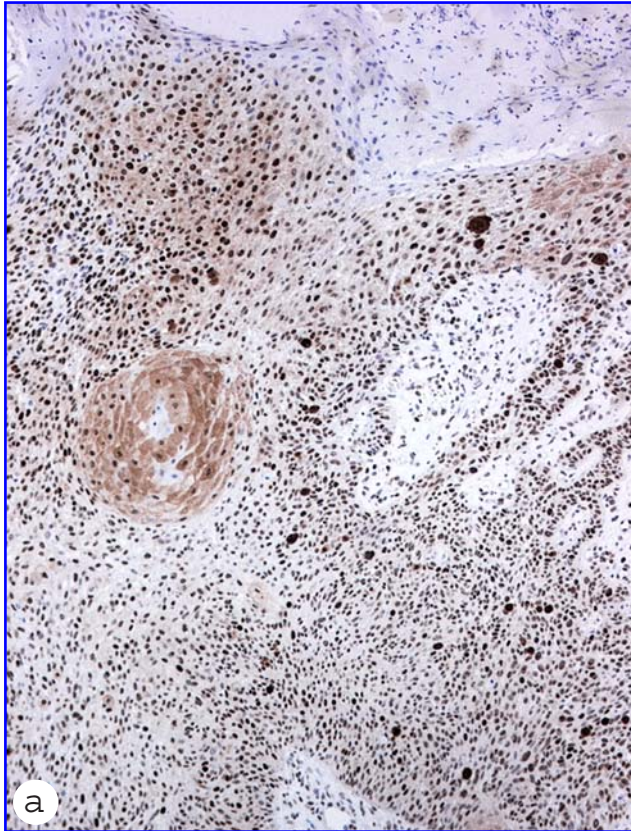


Figura 12. Carcinoma Epidermoide Pobrementemente Diferenciado - Fosfosurvivina

- a. CE infiltrante con una irregular distribución de núcleos inmunomarcados. En las áreas pobremente diferenciadas, la expresión citoplásmica de Fosfosurvivina es muy tenue, si se compara con la intensa tinción del citosol de las células con diferenciación escamosa y que forman el globo córneo del área central de la imagen.
- b. Porción superficial de un CE pobremente diferenciado en el que la mayoría de los núcleos son Fosfosurvivina positivos. La intensidad del inmunomarcaje se incrementa en los núcleos pleomórficos. El moderado inmunomarcaje también se observa en el citoplasma de las células queratinizadas.
- c. CE de grandes dimensiones con predominio de células Fosfosurvivina positivas.
- d. Detalle del caso anterior en el que la mayoría de los núcleos presentan intensa expresión de Fosfosurvivina. Nótese el mínimo marcaje del citoplasma de las células tumorales.
- e. Todos los núcleos tumorales expresan Fosfosurvivina; además, en los núcleos pleomórficos el inmunomarcaje se extiende por todo el nucleoplasma. Algunos linfocitos adyacentes también tienen tinción nuclear, aunque la mayoría de estas células inmunocompetentes son negativas.
- f. Área infiltrante de un CE pobremente diferenciado en el que todos los núcleos tumorales son Fosfosurvivina positivos. En el centro de la imagen existe un nódulo con diferenciación queratósica de células muy pleomórficas con intensa tinción nuclear de Fosfosurvivina, la cual también se observa en el citoplasma de las células tumorales disqueratósicas.

Carcinoma Epidermoide Pobremente Diferenciado

Fosfosurvivina



DATOS CLÍNICOS DE LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS

Las queratosis actínicas se presentaron en pacientes de edad avanzada, y así 7 casos se extirparon en pacientes de edades comprendidas entre los sesenta y seis y los noventa años, mientras que solamente 3 fueron diagnosticados en pacientes más jóvenes (entre los cuarenta y nueve y los sesenta años). Los casos de queratosis actínicas estudiados fueron mayoritariamente diagnosticados en mujeres (siete de diez casos). Las lesiones de queratosis se desarrollaron preferentemente en zonas expuestas al sol, esto es, la cara y el cuero cabelludo (nueve de diez casos) y solo en un caso la lesión asentó en el miembro superior, zonas mucho menos expuestas al sol. Los tamaños de las lesiones tumorales oscilaron entre los 0,4 cm y los 0,9 cm de diámetro, habiéndose estudiado solamente un caso de 0,2 cm. La forma clínica de las queratosis actínicas estudiadas fue de una lesión queratósica que en algunos casos presentaba un aspecto macroscópico que hacía difícil establecer el diagnóstico diferencial clínico con el CE, carcinoma basocelular, verruga vírica y, más rara vez, con léntigo maligno.

La intervención quirúrgica consistió en la exéresis de la tumoración, realizándose extirpación y plastia por cierre directo en la totalidad de los casos. Las intervenciones quirúrgicas se realizaron en algunos casos exclusivamente con anestesia loco-regional, mientras que en otros se asoció una sedación intravenosa (generalmente en pacientes varones). Se trataron como casos de cirugía ambulatoria y en los casos de sedación intravenosa añadida se prorrogó la estancia en el Hospital de Día. Se retiran los puntos entre los siete y los catorce días. Y se realizó en cada paciente una media de cuatro curas en consultas externas. La reincorporación a la actividad cotidiana de cada paciente tuvo una variación de entre una y dos semanas.

Tabla 6. Datos Clínicos de las Queratosis Actínicas

Caso	E/S	Localización	Tamaño (cm)	Cirugía	Diagnóstico Clínico	Diagnost Patol
1	82 M	Cuero cabelludo	0,4x0,4	Ext.C.D.	QA/CE	Q.A.
2	91 M	Mejilla	0,4	Ext.C.D.	CE	Q.A.
3	91 M	Pabellón Auricular	0,4	Ext.C.D.	CE	QA
4	66 M	Cuero Cabelludo	0,3x0,2	Ext.C.D.	Verruga vírica	Q.A.
5	59 V	Cuero Cabelledo	0,6x0,4	Ext.C.D.	Queratosis seborreica/Léntigo maligno	Q.A.
6	84 V	Cuero cabelludo	4,5	Ext.C.D.	EB	Q.A.
7	88 M	Dorso de antebrazo	0,6	Ext.C.D.	EB	Q.A. hipertrófica
8	49 V	Ala Nasal	0,9x0,4	Ext.C.D.	Q.A.	Q.A.
9	67 M	Ala nasal	0,8x0,8	Ext.C.D.	EB	Q.A.
10	60 M	Mano	0,7x0,4	Ext.C.D.	QA/EB	Q.A.

E/S: Edad (años)/Sexo (M= Mujer y V=Varón); Ext.C.D.: Extirpación por Cierre Directo; QA: Queratosis Actínica; CE: Carcinoma Epidermoide; EB: Epitelioma Basocelular.

Figura 13. Queratosis Actínica - Ki67

- a. Epidermis normal y dermis con edema. Algunos queratinocitos basales muestran expresión intranuclear de Ki67.
- b. Epidermis con varias yemas de anexos cutáneos. En la zona central se aprecia una pequeña proliferación de células basales Ki67.
- c. Epidermis normal en zona alejada de la lesión queratósica. Se ven células basales Ki67 positivas y otras negativas. El dermis papilar tiene infiltrados inflamatorios.
- d. Proliferación moderada de células basales con inmunomarcaje de Ki67.
- e. Displasia moderada de la epidermis con células basales y suprabasales Ki67 positivas las cuales también son muy abundantes en los anexos cutáneos.
- f. Complejos pilosebáceos hipertróficos con incremento del índice de células Ki67.
- g. Hiperplasia de complejos pilosebáceos con incremento de Ki67 en las células basales en los folículos pilosos. La epidermis presenta hiperplasia de queratinocitos basales con evidente inmunomarcaje.
- h. Glándulas sebáceas con células Ki67 positivas en la capa basal periférica.
- i. Espirema con células secretoras Ki67 positivas.
- j. Hiperplasia papilomatosa y formación de numerosas crestas epidérmicas con intensa expresión de Ki67 en células basales y suprabasales.
- k. La epidermis y las crestas epidérmicas de la queratosis actínica presentan un índice elevado de Ki67. En el dermis se observa edema y linfangiectasias.
- l. Lesión inicial de queratosis actínica con células basales y suprabasales Ki67 positivas.
- m. Detalle de otro área del caso anterior con núcleos pleomórficos Ki67 positivos.
- n. La zona de queratosis inicial se asocia a evidente linfodiapédesis.
- o. Todos los estratos de la epidermis presentan intenso marcaje de Ki67 positivo.
- p. Queratosis actínica activa e intensos infiltrados linfocitarios en el dermis. **Inset:** La extensa hiperplasia de células basales está formada por células basales Ki67 positivas.
- q. Queratosis actínica con importante proliferación celular y desarrollo de estrato córneo. La mayoría de células epiteliales son Ki67 positivas.
- r. Importante displasia de los queratinocitos epidérmicos los cuales presentan intensa expresión nuclear de Ki67.

Queratosi Actínica

Ki 67

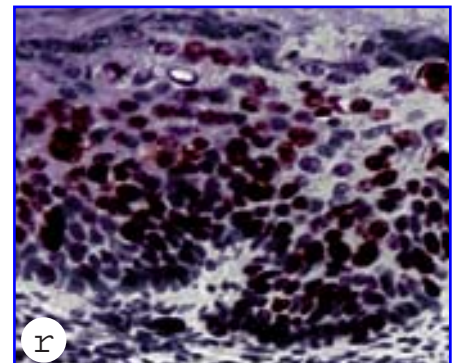
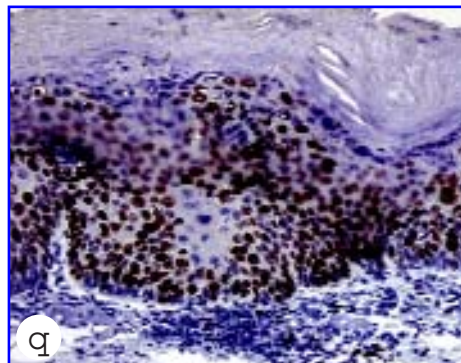
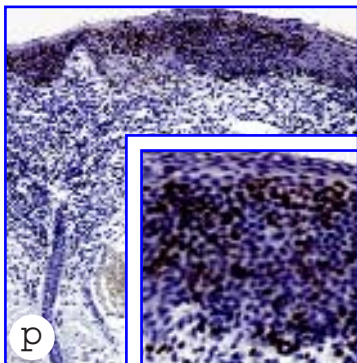
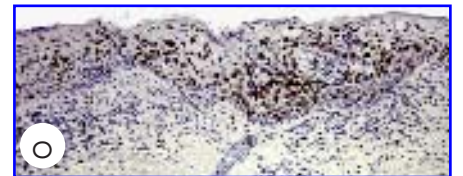
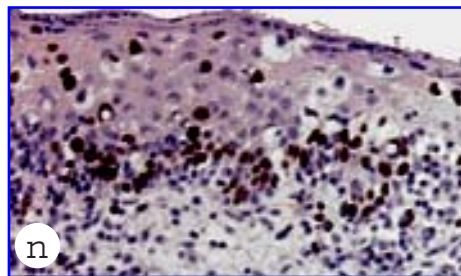
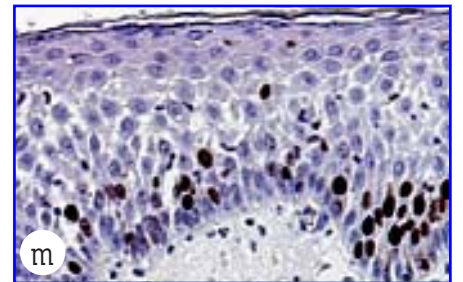
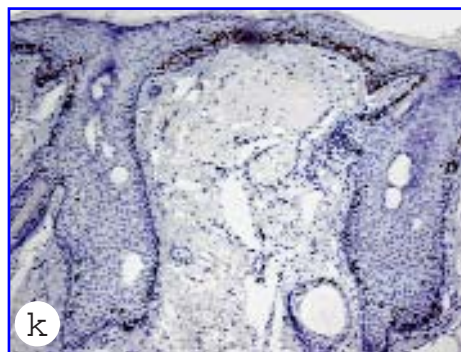
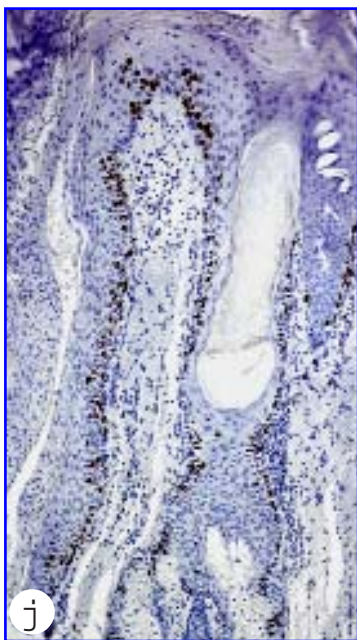
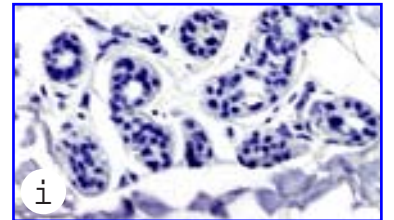
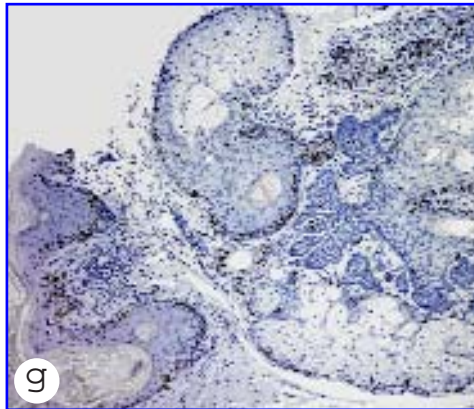
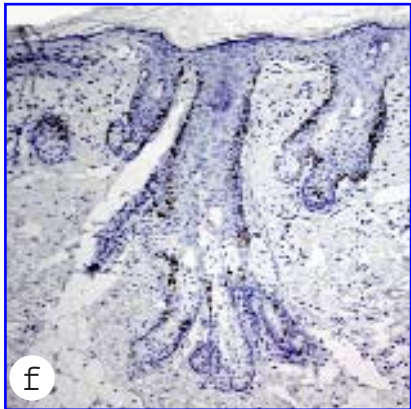
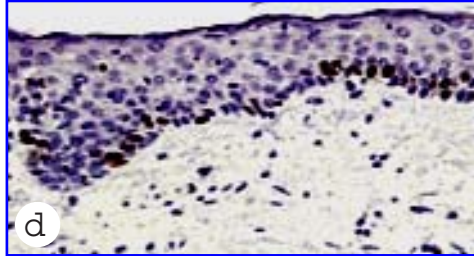
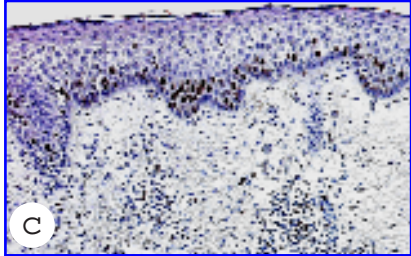
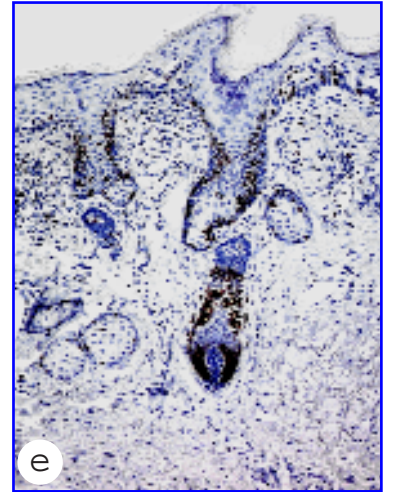
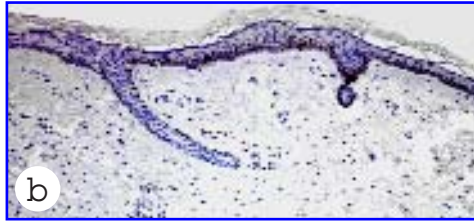
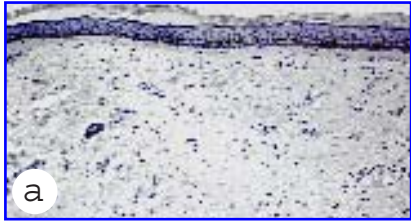


Figura 14. Queratosis Actínica - Ki67

- a. Importante hiperplasia papilomatosa de la epidermis con evidente expresión nuclear de Ki67 en los queratinocitos basales. Los queratinocitos escamosos son negativos.
- b. Lesión hiperplásica papilomatosa y queratósica asociada a abundantes infiltrados inflamatorios del dermis. La expresión de Ki67 aparece en todas las células basales.
- c. Detalle del caso anterior en el que se observan células basales Ki67 positivas y algunas células suprabasales también positivas, mientras que las células escamosas en el estrato córneo son rigurosamente negativas.
- d. Importante proliferación de los queratinocitos basales epidérmicos con alto índice Ki67. El límite de esta zona hiperplásica con el dermis adyacente es nítido, no evidenciándose células tumorales infiltrantes.
- e. Múltiples nidos sólidos de proliferación de células basales con un intenso infiltrado de linfocitos. Nótese el alto índice de Ki67 y la perfecta delimitación de los nidos epiteliales con el dermis papilar adyacente.
- f. Interfase entre la epidermis normal y la proliferación de queratinocitos en la zona queratósica. El índice Ki67 es muy elevado.
- g. La mayoría de las células suprabasales y del estrato escamoso son Ki67 positivas.
- h. Importante pleomorfismo nuclear con intenso marcaje nuclear de Ki67 en los queratinocitos displásicos.
- i. Queratosis actínica con muy intensa proliferación celular presente en los queratinocitos basales proliferantes y también en las áreas con diferenciación escamosa. Destaca la presencia de extensos nódulos linfoides.
- j. Otro área del caso anterior en la que los folículos linfoides quedan atrapados por epitelio escamoso con alto índice de Ki67.

Queratosis Actínica

Ki 67

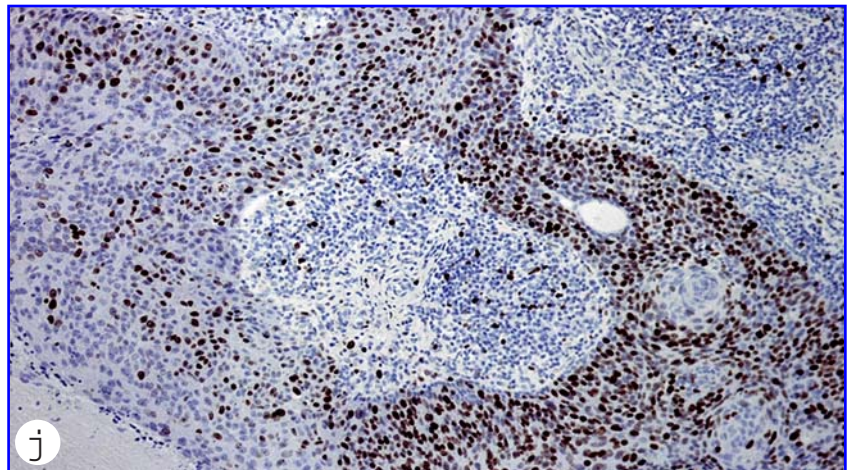
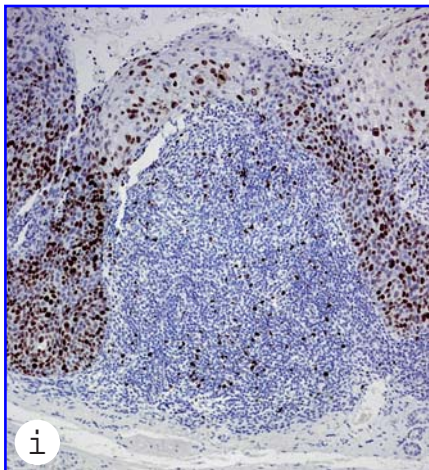
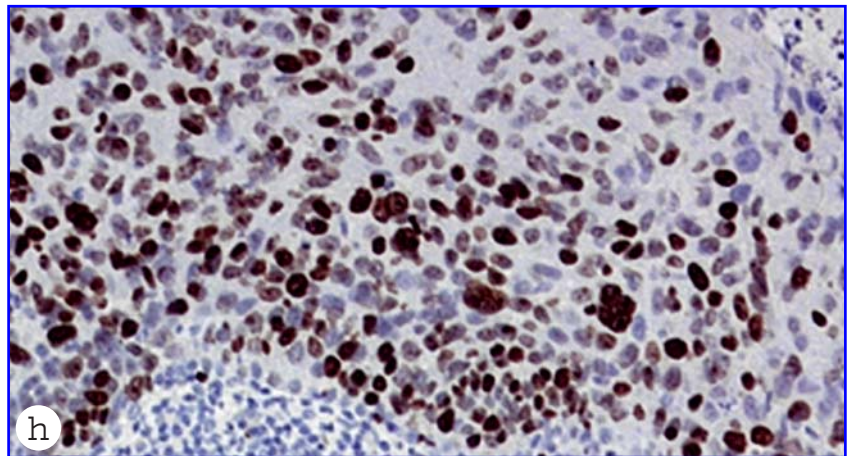
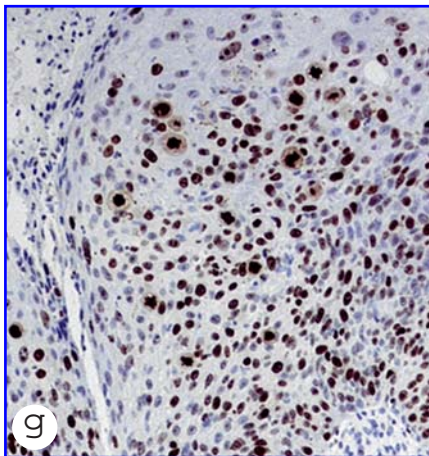
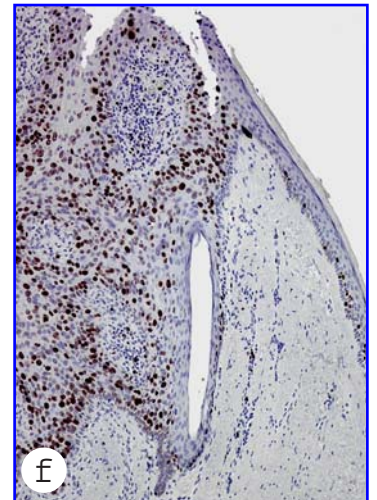
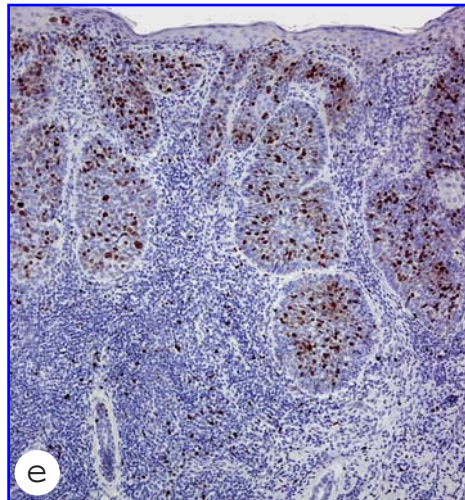
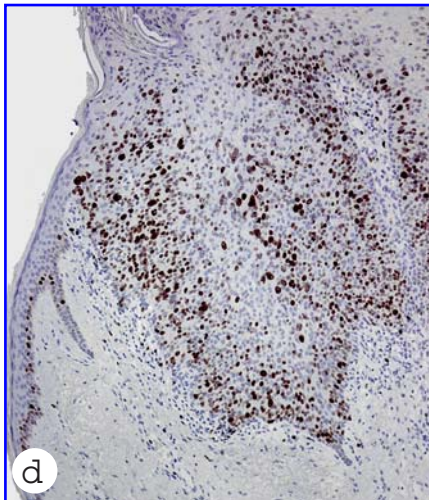
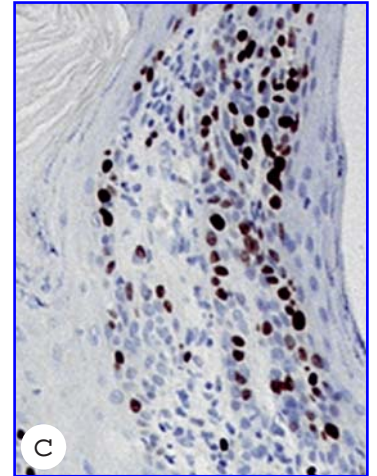
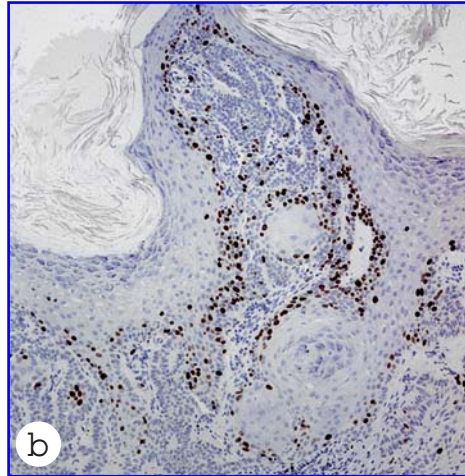
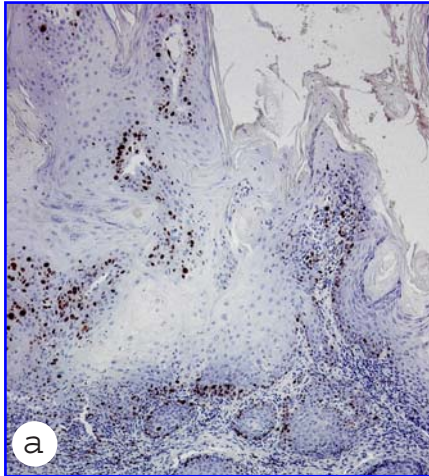


Figura 15. Queratosis Actínica - p53

- a. Epidermis normal con expresión de p53 en los núcleos de las células basales.
- b. Inicio de la proliferación celular en una queratosis actínica con marcaje nuclear de p53 en células basales y suprabasales.
- c. La proteína p53 se expresa en los queratinocitos basales epidérmicos y en las células basales del folículo piloso. En la epidermis se ve lesión inicial de queratosis actínica. **Inset:** Detalle de células basales y suprabasales p53 positivas.
- d. La proliferación queratósica de la epidermis se caracteriza por células suprabasales p53 positivas.
- e. Alrededor de un folículo piloso las áreas queratósicas, con incremento de p53, penetran en el dermis papilar.
- f. Queratosis actínica nodular con abundante proliferación de células que empujan al dermis. La mayoría de los queratinocitos son p53 positivos.
- g. Nidos de queratosis actínica que penetran en el dermis con importantes infiltrados inflamatorios. La delimitación de la proliferación epitelial con el tejido conjuntivo es nítida. La mayoría de las células son p53 positivas.
- h. Extensa proliferación de células basales p53 positivas. La epidermis supra adyacente es normal.
- i. Queratosis actínica de grandes dimensiones que empuja al dermis. El índice de p53 es mucho más alto que en la epidermis normal.
- j. Zona periférica de una queratosis actínica muy proliferativa asociada a necrosis e inflamación. Se observa un alto índice de p53.
- k. Queratosis actínica de grandes dimensiones asociada a múltiples folículos linfoides. Se observa un intenso número de queratinocitos proliferantes con intensa expresión intranuclear de p53.
- l. Detalle de la porción inferior de la figura anterior, las áreas con hiperplasia de células basales indiferenciadas contienen células p53 positivas.
- m. Detalle de la porción superficial de la figura anterior; nótese una relación inversa entre el número de núcleos p53 positivos y la mayor diferenciación del estrato escamoso en relación con la queratosis actínica.

Queratosis Actínica

p53

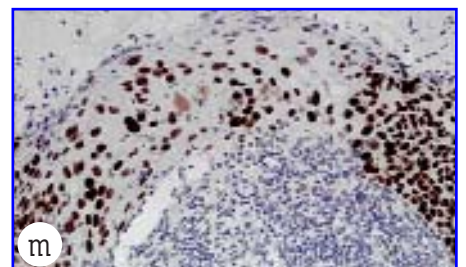
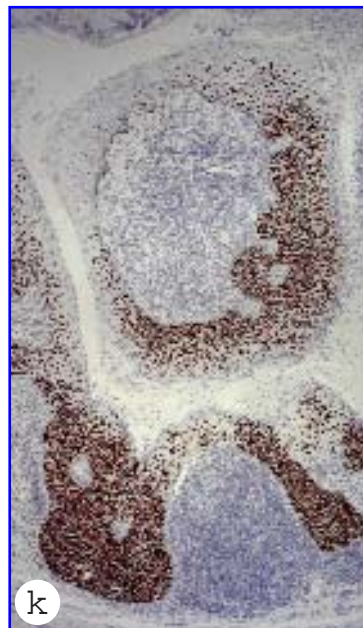
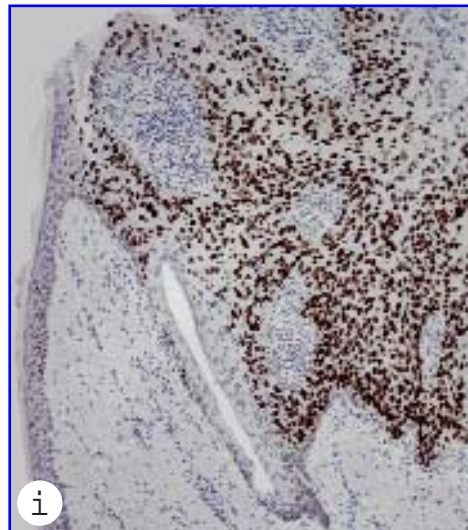
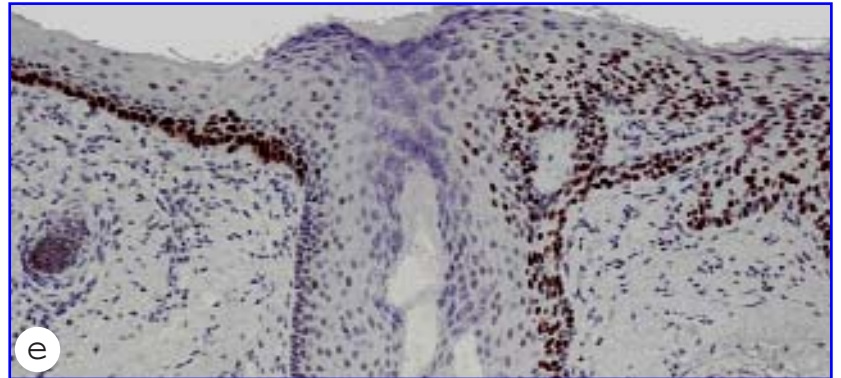
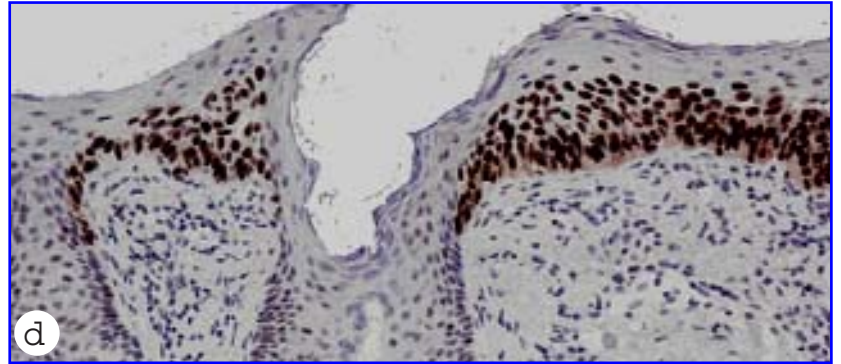
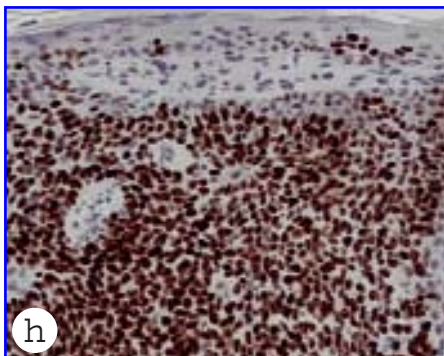
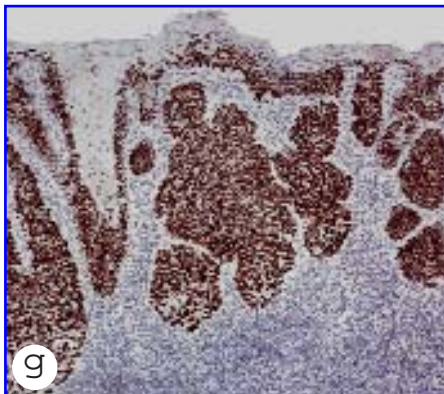
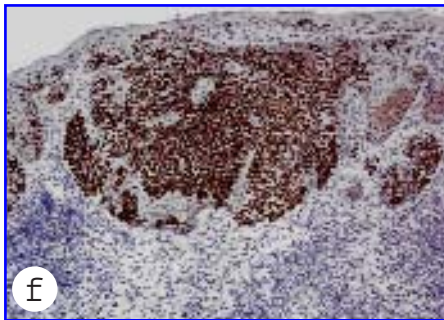
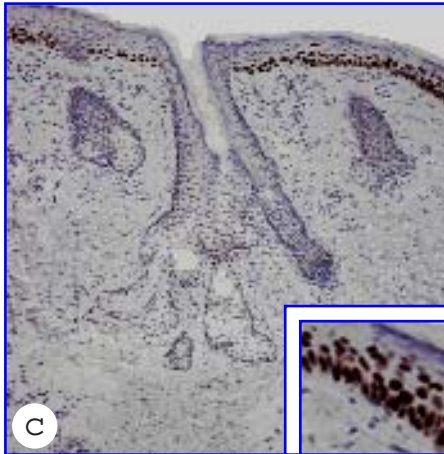
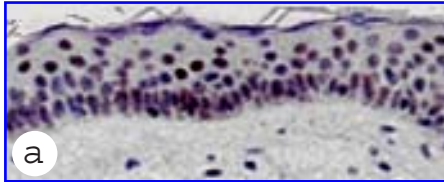


Figura 16. Queratosis Actínica - Aurora A

- a. Intensa tinción nuclear de Aurora A en queratinocitos basales, ausencia de inmunotinción en el estrato escamoso.
- b. Lesión inicial de queratosis actínica y complejo pilosebáceo. **Inset:** la mayoría de las células basales y algunas suprabasales son Aurora A positivas.
- c. Importante proliferación de células basales Aurora A positivas.
- d. Queratosis actínica con inflamación en el dermis. Alta positividad de Aurora A en la proliferación de células basales, y menor inmunomarcaje en el estrato escamoso.
- e. La superficie epidérmica está ulcerada en el área de la proliferación de queratinocitos Aurora A positivos que invaden empujando al dermis.
- f. La expresión de Aurora A se extiende a los núcleos de las células poligonales y planas del estrato escamoso. **Inset:** Aurora A muy intensa en los núcleos de queratinocitos isomórficos y pleomórficos.
- g. Piel con estrato córneo engrosado e inflamación. Los núcleos de todas las células del estrato escamoso y granuloso y células planas más superficiales presentan intenso inmunomarcaje de Aurora A, característico de una queratosis actínica activada.
- h. Interfase de la epidermis normal con la lesión de queratosis actínica. Aurora A es positiva en todas las células queratósicas y en la mayoría de las células basales de la epidermis normal.
- i. Queratosis actínica invasiva, con masas sólidas de proliferación de queratinocitos basales, que penetran empujando el dermis papilar y reticular. Nótese que todos los núcleos de las áreas de queratosis son Aurora A positivos.
- j. Otro campo del caso anterior en el que el marcaje nuclear también se observa en todos los queratinocitos de la epidermis que cubre la lesión queratósica.
- k. Extensa masa tumoral de células poco diferenciadas que invade el dermis profundo, englobando anexos cutáneos. Se ven nódulos satélites de queratinocitos con disqueratosis, bien delimitados y que empujan el dermis papilar. **Inset:** La expresión de Aurora A es más abundante en las células basales que en los queratinocitos con diferenciación escamosa.
- l. Queratosis actínica de grandes dimensiones con patrón papilomatoso y con áreas de cornificación. Todos los núcleos de las células basales de las papilas son Aurora A positivos, mientras que su índice es menor en las células con diferenciación escamosa.

Queratosis Actínica

Aurora A

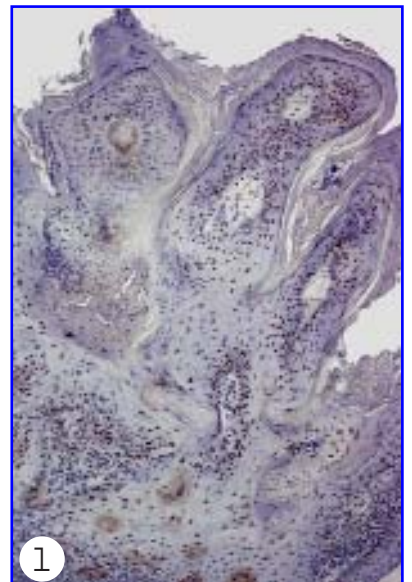
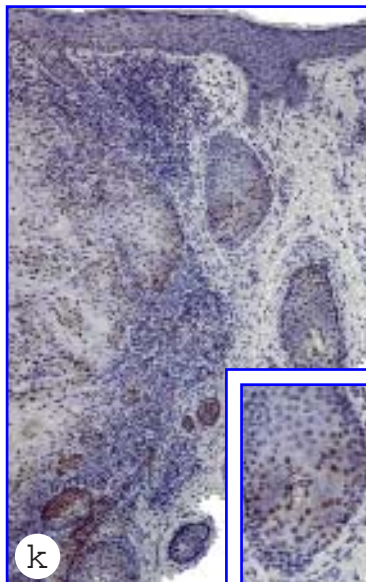
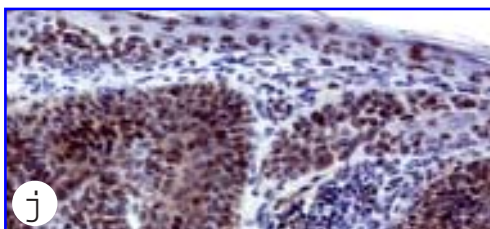
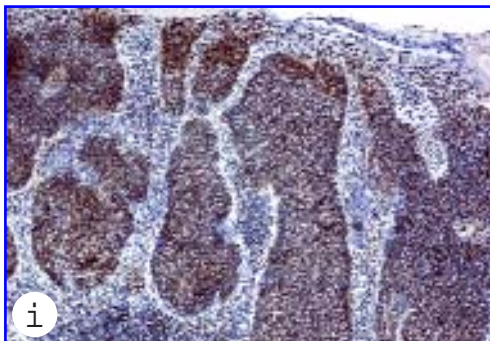
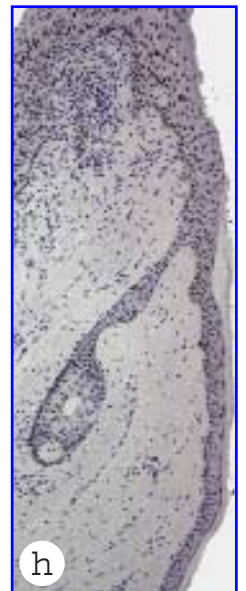
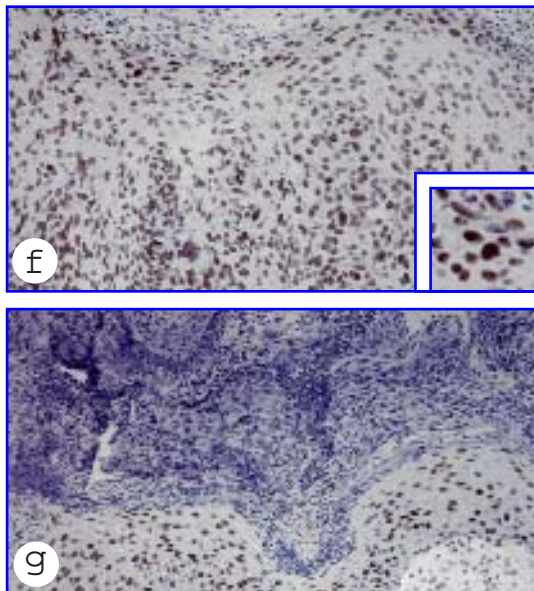
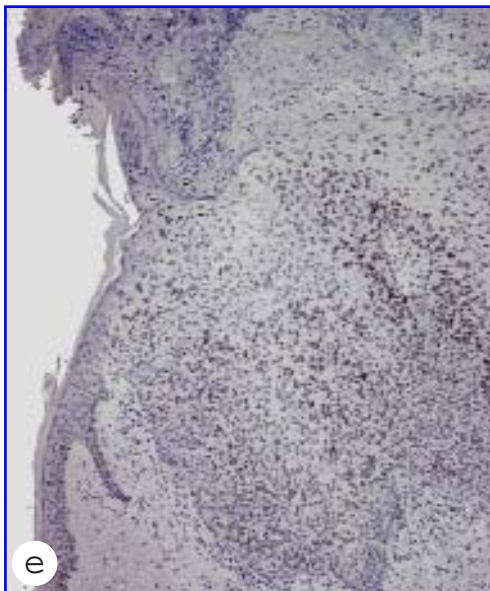
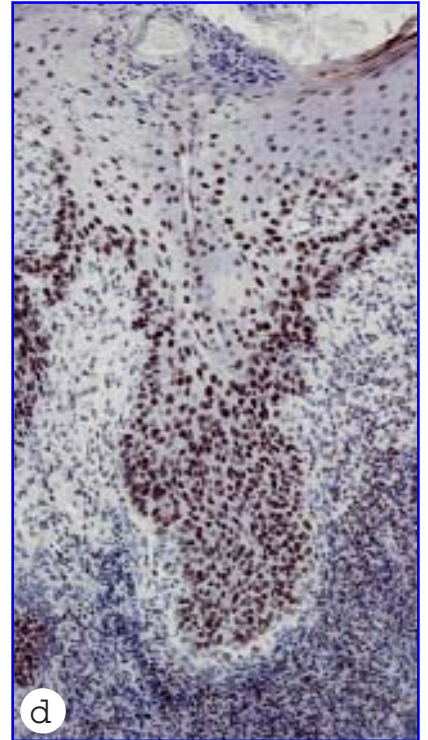
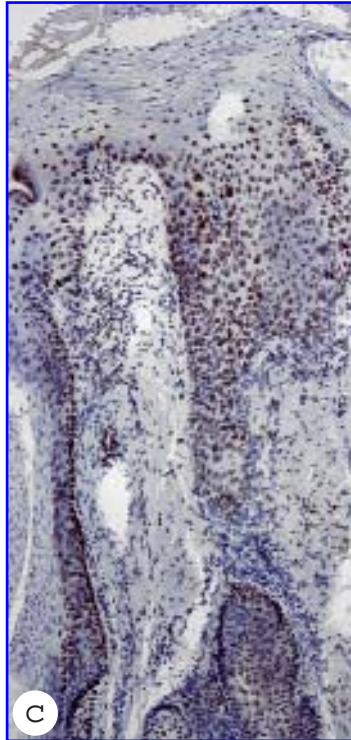
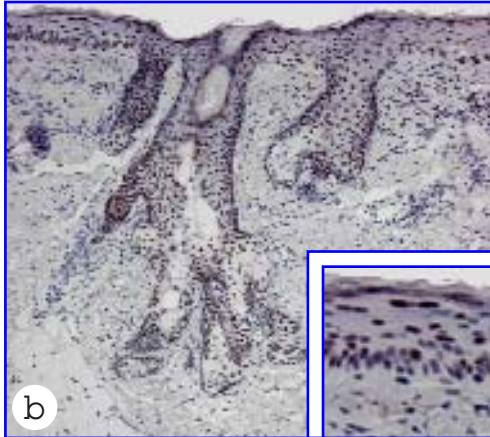
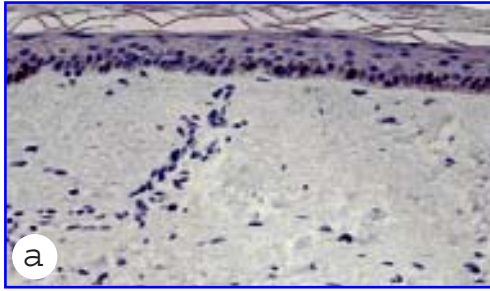


Figura 17. Queratosis Actínica - Aurora B

- a. La Aurora B se ve en algunos núcleos de las células basales y del estrato escamoso de la epidermis normal; sin embargo, en la vecindad de las lesiones con queratosis actínica, se incrementa el índice de Aurora B. **Inset:** Intensa expresión de Aurora B intranuclear en todas las células basales y suprabasales con cambios de disqueratosis.
- b. Queratosis Actínica no muy proliferada y anexo cutáneo. **Inset:** Ligera displasia de queratinocitos y marcaje de Aurora B en las células basales y parabasales.
- c. Proliferación epidérmica con alto índice de células Aurora B positivas.
- d. Desorganización del estrato escamoso en un caso de queratosis actínica inicial. Destaca el alto índice de expresión de Aurora B en las células del estrato escamoso.
- e. Detalle del caso anterior: La diferenciación de queratinocitos en el estrato escamoso es solo moderada y además todos los núcleos son Aurora B positivos.
- f. Proliferación de células basales inmaduras que ocupan todos los estratos de la epidermis. Todos los núcleos son isomórficos y expresan Aurora B.
- g. Otro área del caso anterior con muy abundante repuesta inflamatoria en el dermis.
- h. Múltiples nódulos de lesiones de queratosis actínica penetrando en el dermis profundo e intensa respuesta inflamatoria. Los queratinocitos expresan Aurora B.
- i. Queratosis actínica muy invasiva, inflamación y alto índice de Aurora B en zonas infiltrantes y en células basales y suprabasales de la epidermis; la expresión en el estrato escamoso y granuloso es menor.
- j. Interfase de la piel normal con el nódulo de queratosis actínica que infiltra el dermis.
- k. Zona central y superficial del caso anterior en que los nidos proliferantes están cubiertos por epidermis. En el estrato escamoso la expresión de Aurora B es menor.
- l. Borde contralateral del caso anterior. El límite de la masa queratósica con el dermis adyacente es nítido.
- m. Detalle del área superficial central con persistencia de la actividad intranuclear de Aurora B persiste en todos los estratos de la epidermis, incluido las células escamosas.
- n. La expresión nuclear de Aurora B es constante en las células basales proliferantes, pero disminuye cuando progresa la queratinización de las células del estrato escamoso.
- o. Folículos linfoides hiperplásicos asociados a una queratosis actínica.
- p. Detalle de la imagen anterior en la que todas las células queratósicas y algunos linfocitos muestran expresión nuclear de Aurora B.

Queratosis Actínica

Aurora B

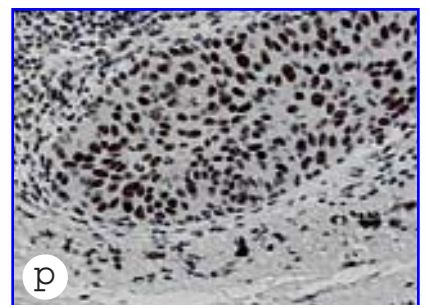
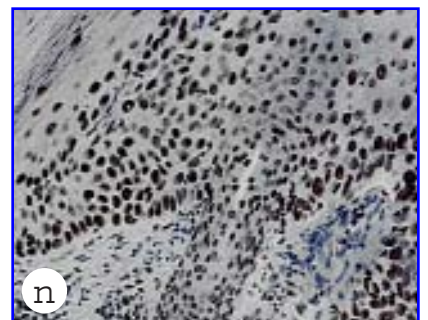
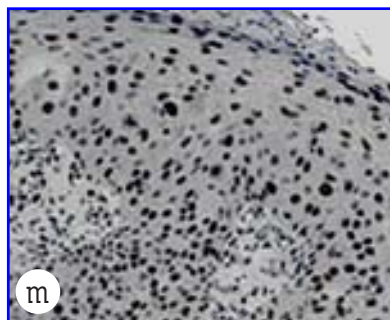
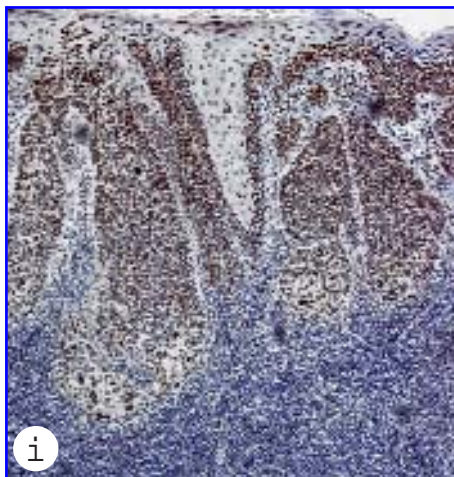
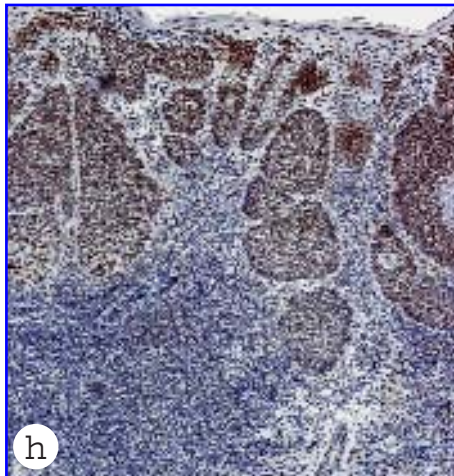
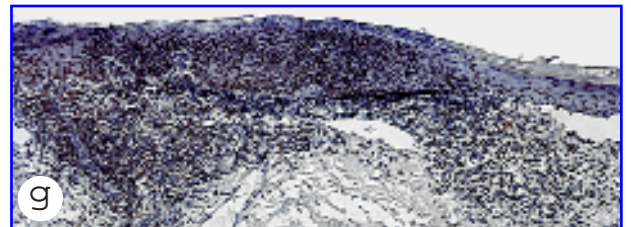
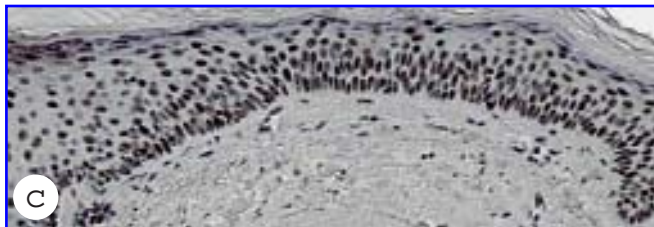
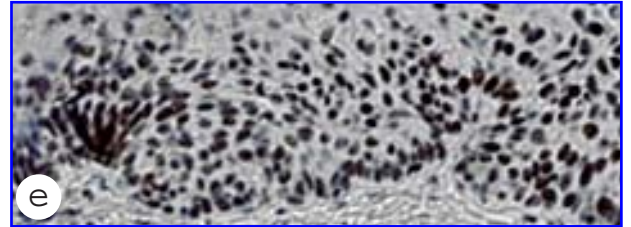
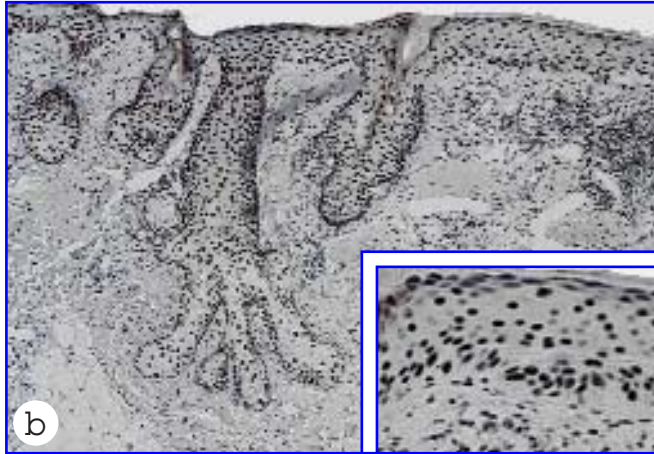
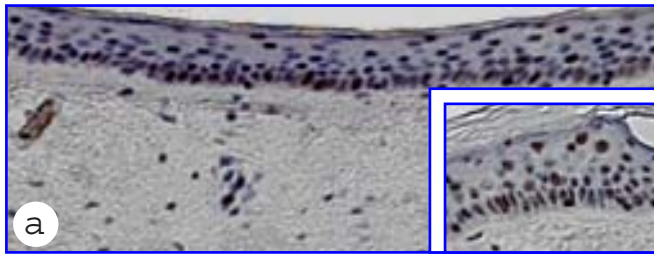


Figura 18. Queratosis Actínica - Survivina

- a. Epidermis normal. La Survivina se expresa en el núcleo y en el citoplasma de las células basales. A medida que se produce la queratinización, las células del estrato escamoso pierden la expresión citoplasmática, persistiendo el marcaje nuclear.
- b. Inicio de lesiones de queratosis actínica. La expresión de Survivina aparece en todos los núcleos y se extiende al citoplasma de las células epidérmicas y foliculares.
- c. Queratosis actínica. El citoplasma del estrato córneo carece de Survivina.
- d. Intensa expresión de Survivina en las células basales y suprabasales; sin embargo, en los queratinocitos del estrato escamoso aplanados y con máxima queratinización, la expresión de Survivina citoplasmática es significativamente menor.
- e. Nidos de queratosis, bien delimitados, penetrando en el dermis superficial. La intensidad del marcaje nuclear de Survivina es intensa, pero la citoplásmica es variable.
- f. Moderada hiperplasia de queratinocitos basales, maduración del epitelio escamoso y masas queratóticas que penetran en el dermis. Destaca la progresiva disminución del marcaje citoplásmico a medida que aumenta la queratinización.
- g. Queratosis actínica de gran extensión con múltiples masas de queratinocitos proliferantes que penetran empujando el dermis. La Survivina es muy intensa.
- h. Otra área del caso anterior. Las células basales indiferenciadas tienen máxima expresión de Survivina la cual disminuye en las zonas de queratinización.
- i. La expresión de Survivina intracitoplasmática está ausente en la células planas.
- j. Zona proliferativa papilomatosa central del mismo caso. Las lesiones de queratosis actínica y los linfocitos muestran una máxima expresión de Survivina.
- k. La intensidad de Survivina se mantiene en el borde contralateral de la lesión.
- l. Queratosis actínica que llega al dermis profundo. Los queratinocitos, con moderada queratinización tienen variable expresión citoplásmica de Survivina.
- m. Queratosis actínica con queratinocitos muy desorganizados. Destaca un moderado índice de núcleos Survivina positivos y una muy baja tinción en el citoplasma
- n. La queratosis actínica en el dermis profundo, con numerosos folículos linfoides. Intenso marcaje nuclear y citoplasmático de los queratinocitos indiferenciados.
- o. Porción superficial del caso anterior, con intenso marcaje nuclear de Survivina y menor expresión en el citoplasma. Los núcleos de los linfocitos son positivos.

Queratosis Actínica

Survivina

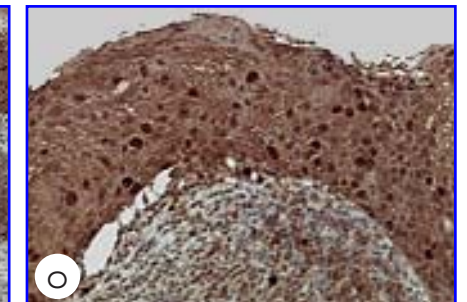
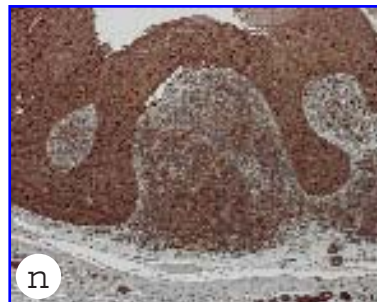
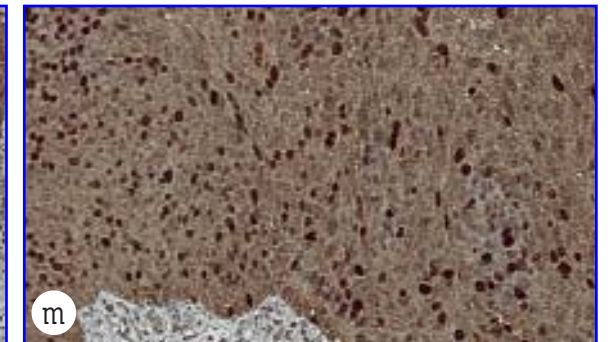
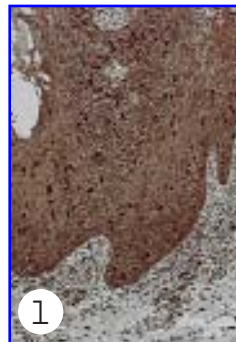
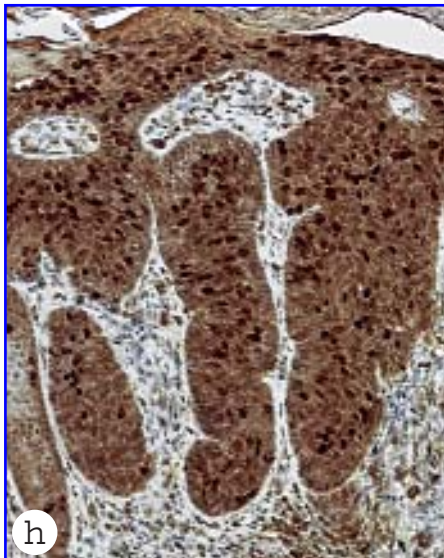
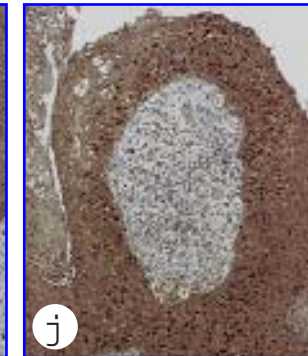
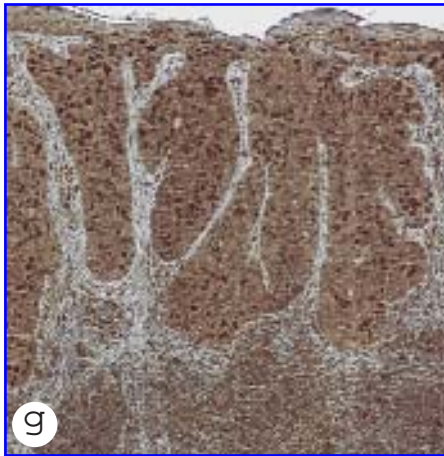
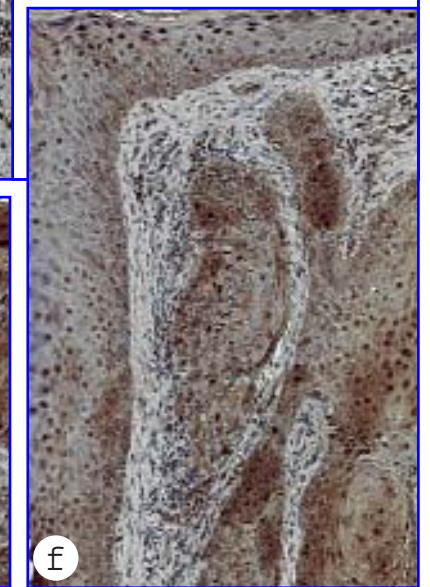
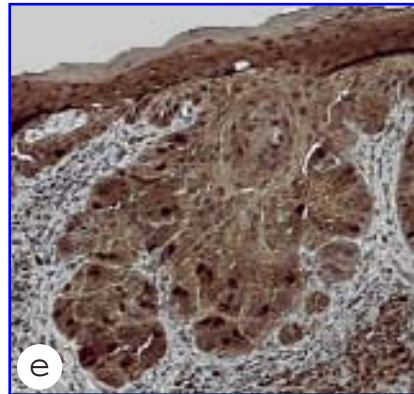
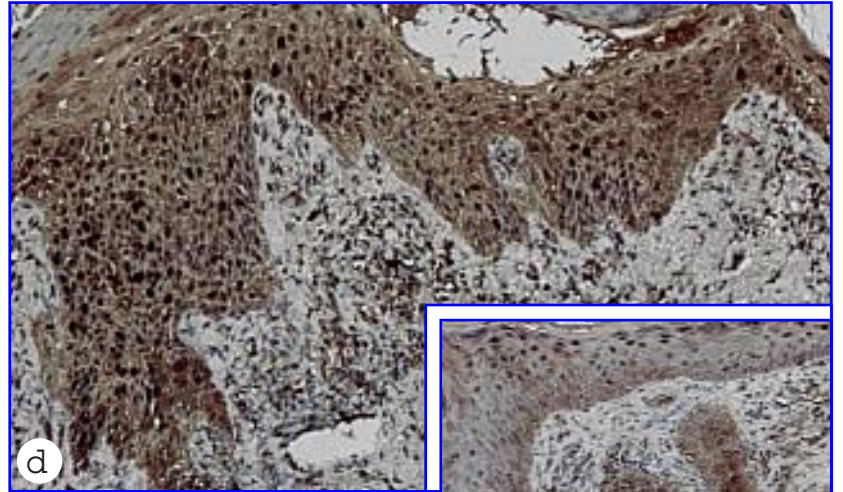
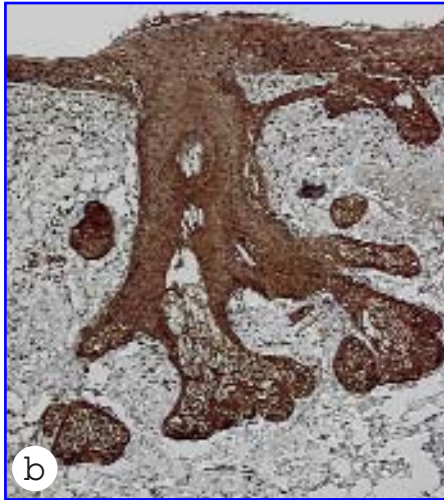
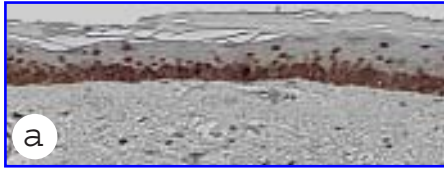
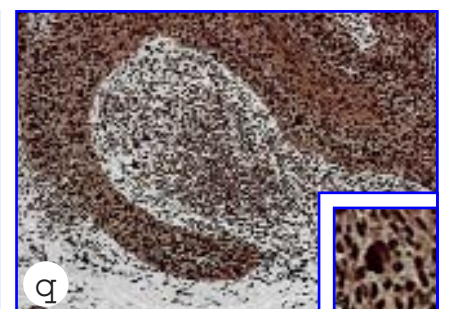
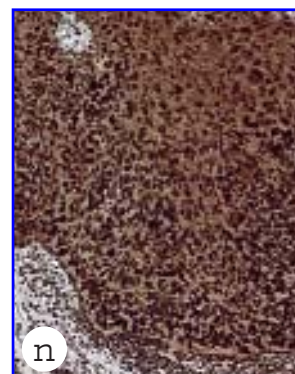
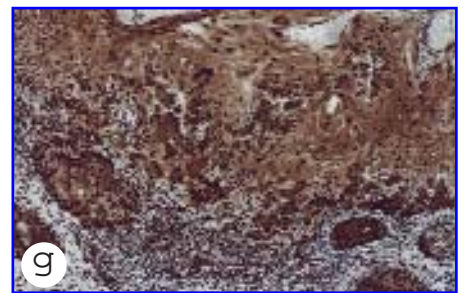
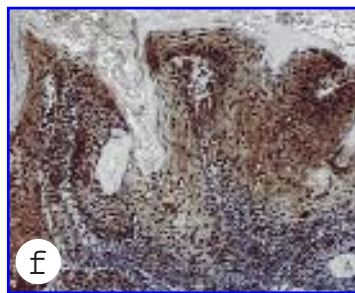
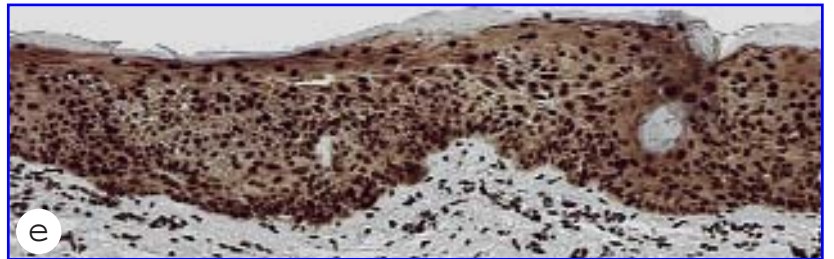
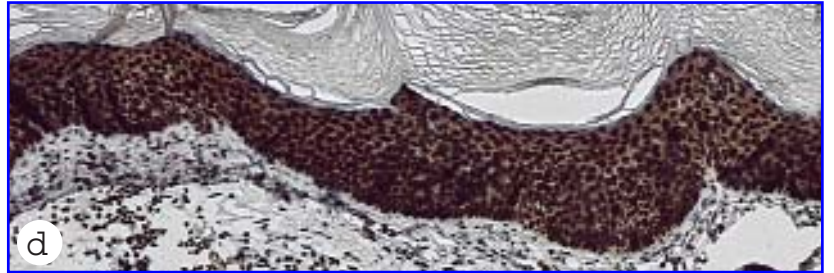
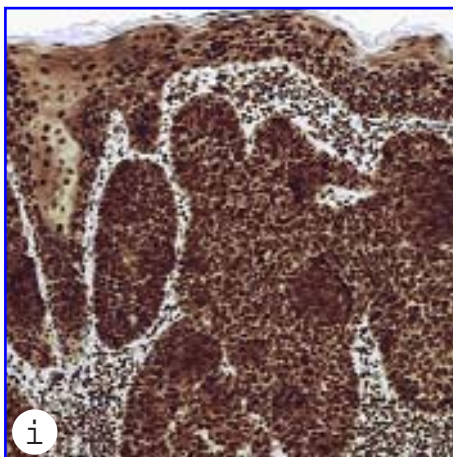
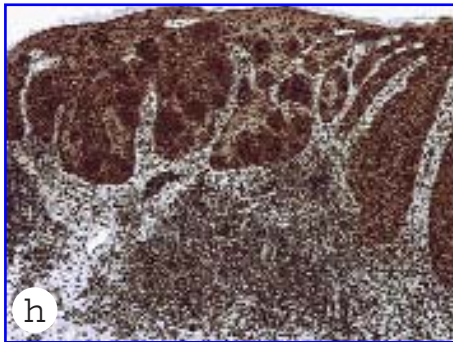
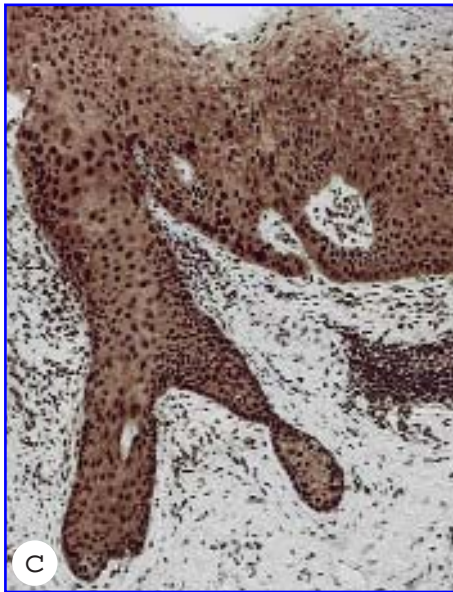
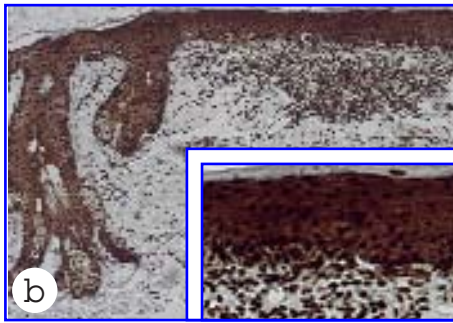
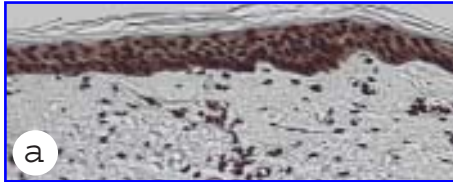


Figura 19. Queratosis Actínica - Fosfosurvivina

- a. Intensa expresión nuclear y citoplásmica de Fosfosurvivina en todos los estratos de la epidermis normal, y en los núcleos de las células del tejido conjuntivo del dermis.
- b. Queratosis actínica inicial. Intensa expresión nuclear y citoplásmica de Fosfosurvivina. **Inset:** epitelio con proliferación y displasia nuclear e intensa tinción.
- c. Queratosis actínica y folículo piloso. Todos los núcleos son Fosfosurvivina positivos. La tinción del citoplasma disminuye a medida que se incrementa la queratinización.
- d. Fosfosurvivina muy positiva en una hiperplasia de células basales indiferenciadas de una queratosis actínica. Destaca la ausencia de marcaje en el estrato córneo.
- e. La intensidad de tinción citoplásmica es menor en las áreas con diferenciación escamosa que en las zonas de células basales indiferenciadas.
- f. Queratosis actínica con patrón papilomatoso y con extensa cornificación. La expresión citoplasmática de Fosfosurvivina está ausente en las laminillas cornificadas.
- g. Desorganización del epitelio y células escamosas disqueratóticas que aún conservan un tenue o moderado inmunomarcaje citoplásmico de Fosfosurvivina.
- h. Intensa expresión de Fosfosurvivina intranuclear y citoplásmica en todos los nidos sólidos de esta queratosis actínica infiltrante y en los núcleos de los linfocitos.
- i. La intensidad de expresión citoplásmica de Fosfosurvivina es inversa al aumento de la queratinización de las células displásicas de la queratosis actínica
- j. Queratosis actínica nodular de grandes dimensiones que empuja al dermis. Hay marcaje nuclear y citoplasmático de Fosfosurvivina, excepto en el estrato córneo.
- k. Marcaje de Fosfosurvivina en el epitelio displásico y en los núcleos de los linfocitos.
- l. Extremo contralateral del caso anterior con idéntica expresión de Fosfosurvivina.
- m. Proliferación de células basales pleomórficas Fosfosurvivina positivas.
- n. Queratinocitos disqueratóticos y tenue marcaje de Fosfosurvivina en el citoplasma.
- o. Queratosis actínica con expresión de Fosfosurvivina en el citoplasma y en los núcleos de las células epiteliales, y en los núcleos de los linfocitos.
- p. En el citoplasma de los queratinocitos displásicos se ve tenue tinción de Fosfosurvivina.
- q. Proliferación queratótica que rodea a los folículos linfoides. **Inset:** Células epiteliales de núcleos grandes y pleomórficos, con una intensa tinción de Fosfosurvivina, sin embargo la expresión citoplasmática es tenue.

Queratosis Actínica

Fosfosurvivina



CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS (Tabla 7).

Caso	Ki 67		p53		Aur A		Aur B		Surv		F Surv	
	BD	PD	BD	PD	BD	PD	BD	PD	BD	PD	BD	PD
1	23	42	15	87	73	88	37	69	92	98	99	85
2	42	40	13	78	69	91	41	74	94	98	87	79
3	40	54	7	81	78	86	32	57	98	92	74	86
4	30	47	9	76	81	79	65	85	97	94	88	93
5	48	48	12	80	63	68	49	76	88	92	93	92
6	32	39	17	73	56	67	54	73	90	91	96	79
7	38	64	21	79	65	64	40	69	93	90	81	90
8	37	30	16	71	77	76	60	76	89	93	89	73
9	42	72	5	91	59	89	53	70	83	89	96	79
10	41	55	23	64	86	81	57	87	78	97	97	83
11	27	39	31	88	65	64	51	78	96	93	91	69
12	30	50	19	53	72	93	50	83	91	94	88	82
13	40	56	7	69	77	90	46	65	85	82	70	93
14	35	68	24	91	63	75	42	69	79	94	75	76
15	34	62	19	88	69	77	57	63	92	95	86	80
16	41	78	43	79	58	72	60	82	88	87	92	64
17	38	80	28	68	80	86	53	78	81	90	78	83
18	33	61	36	89	61	91	61	72	79	84	67	81
19	18	47	15	84	66	69	66	86	92	96	95	92
20	46	76	27	76	53	77	54	79	88	91	88	89
21	41	89	32	90	60	84	39	82	84	90	76	76
22	35	52	20	83	69	81	43	74	89	87	98	90
23	46	46	37	88	75	72	37	68	92	92	83	88
24	36	44	11	69	78	91	59	78	90	91	79	83
25	38	63	9	73	60	89	48	71	78	86	75	71
26	35	44	24	88	67	78	55	63	94	89	82	65
27	31	56	32	91	74	89	39	49	83	93	89	93
28	39	39	23	82	81	84	27	55	87	95	94	85
29	31	69	41	91	73	79	46	61	75	94	89	69
30	52	55	26	84	68	66	63	79	91	88	97	88
\bar{x} $\pm SD$	37 ± 7	55 ± 14	21 ± 10	80 ± 9	69 ± 8	80 ± 9	48 ± 10	72 ± 9	88 ± 6	92 ± 4	86 ± 9	82 ± 9

Aur: Aurora; Surv: Survivina; F Surv: Fosfosurvivina; BD: Bien diferenciado; PD: Poco diferenciado.

SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS

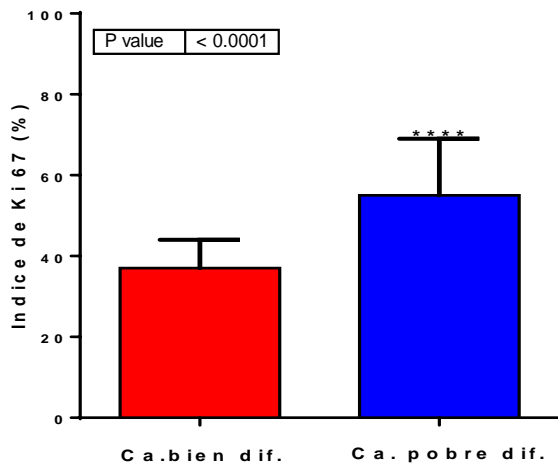


Figura 20. Comparación de la expresión de Ki 67 en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

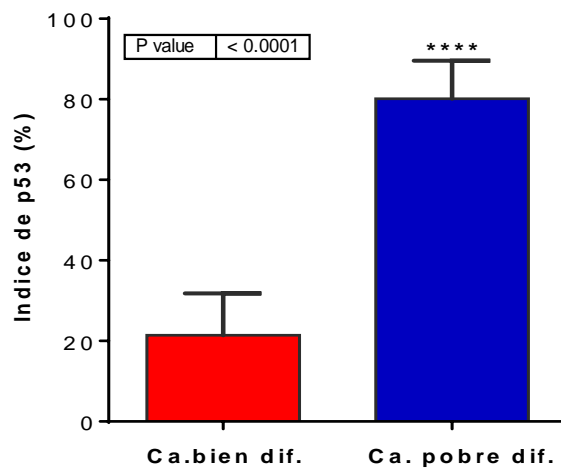


Figura 21. Comparación de la expresión de p53 en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

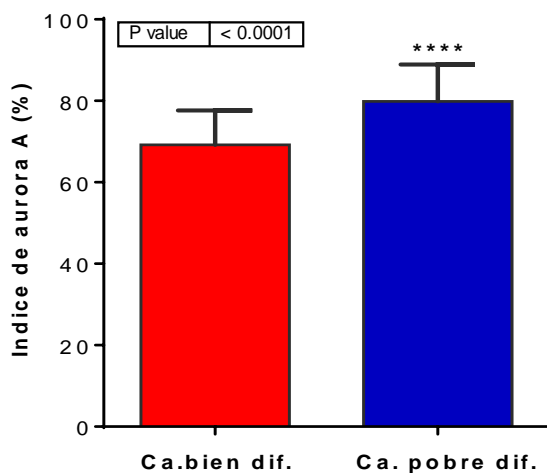


Figura 22. Comparación de la expresión de Aurora A en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

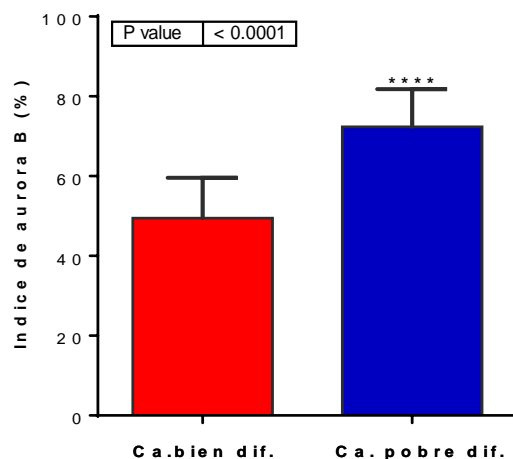


Figura 23. Comparación de la expresión de Aurora B en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

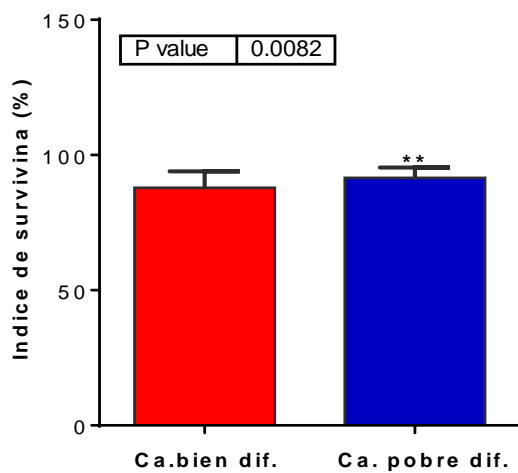


Figura 24. Comparación de la expresión de Survivina en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

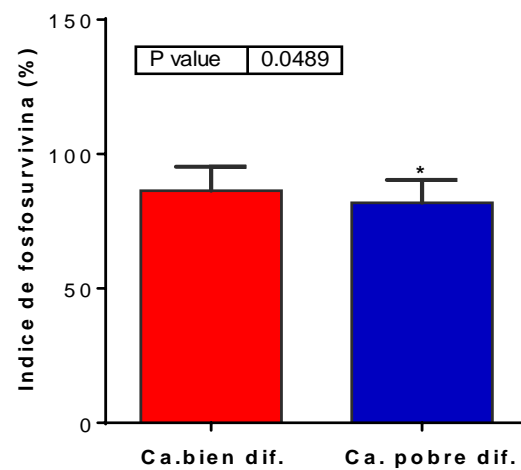


Figura 25. Comparación de la expresión de Fosfosurvivina en las áreas bien diferenciadas y pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

CUANTIFICACIÓN DE LOS MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LA PIEL NORMAL (Tabla 8).

Caso	Ki 67		p53		Aur A		Aur B		Surv		F Surv	
	QA	PN	QA	PN	QA	PN	QA	PN	QA	PN	QA	PN
1	37		89		53		89		53		93	
2	22		72		84		93		85		100	
3	53		67		27		31		56		100	
4	62	11	84	55	59	21	57	29	88	31	100	37
5	91	3	53	47	48	27	80	31	81	43	100	100
6	70	9	79	39	76	14	56	23	73	59	98	92
7	83		70		72		65		78		100	
8	62		82		63		89		62		89	
9	34	5	74	26	35	20	71	16	74	48	100	100
\bar{x}	57	3	74	19	60	9	70	11	72	20	98	37
$\pm SD$	± 23	± 4	± 11	± 23	± 22	± 11	± 20	± 14	± 13	± 25	± 4	± 47

Aur: Aurora; Surv: Survivina; F Surv: Fosfosurvivina; QA: Queratosis actínica; PN: Piel normal.

SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LA PIEL NORMAL

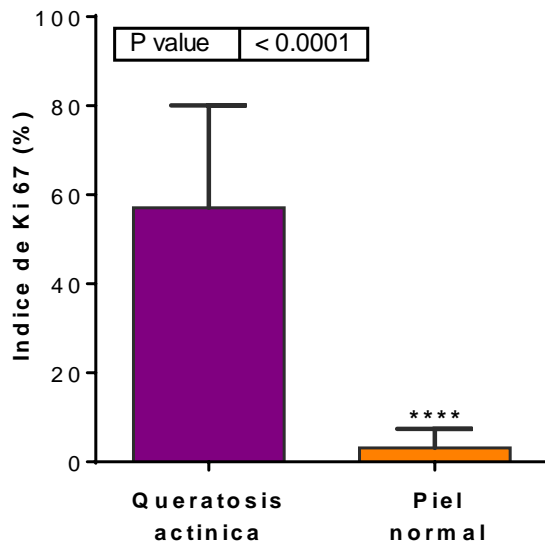


Figura 26. Comparación de la expresión de Ki 67 en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

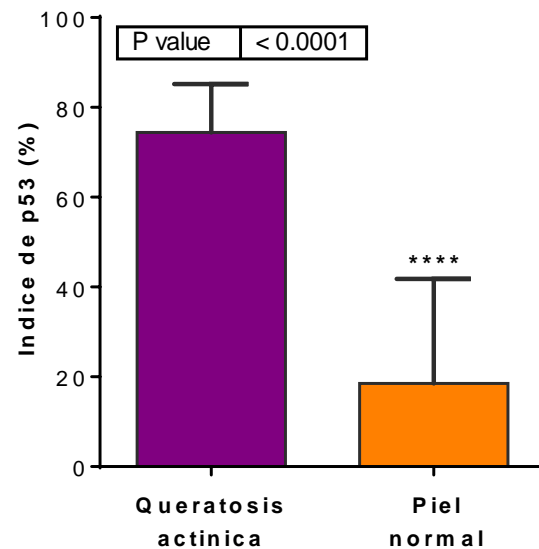


Figura 27. Comparación de la expresión de p53 en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

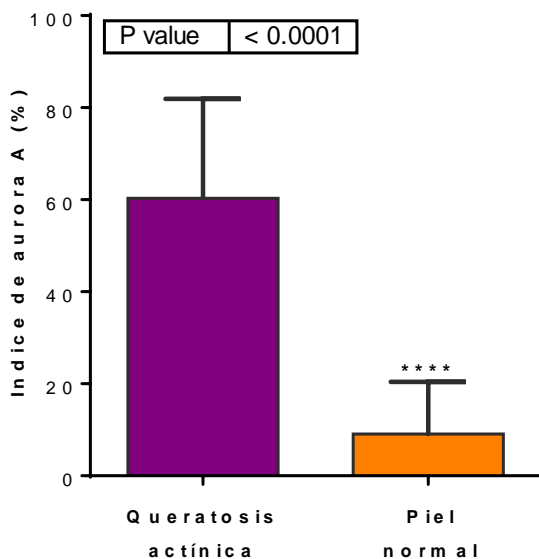


Figura 28. Comparación de la expresión de Aurora A en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

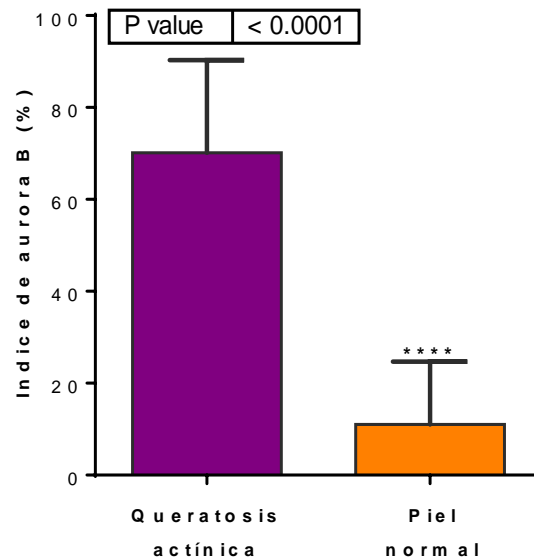


Figura 29. Comparación de la expresión de Aurora B en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

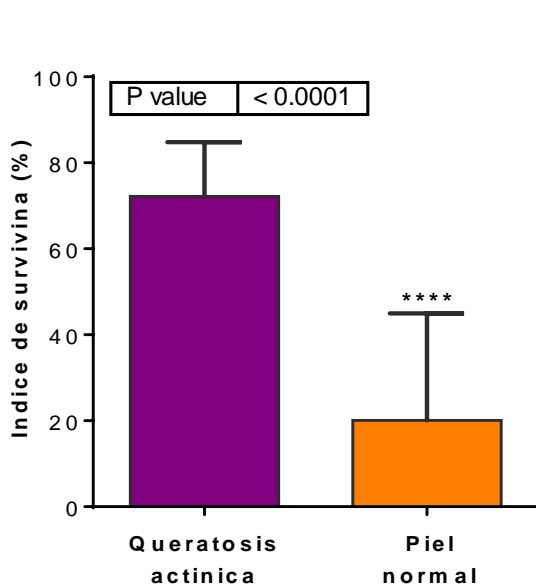


Figura 30. Comparación de la expresión de Survivina en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

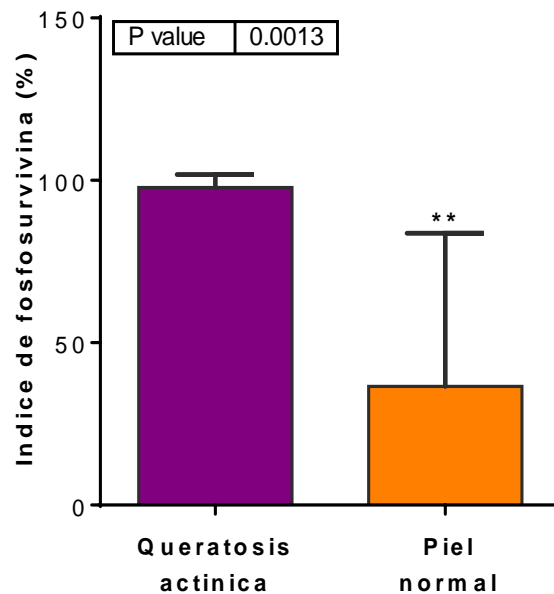


Figura 31. Comparación de la expresión de Fosfosurvivina en las Queratosis Actínicas en relación con la piel normal.

SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA DE LA COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES MARCADORES DEL CICLO CELULAR EN LAS QUERATOSIS ACTÍNICAS EN RELACIÓN CON LAS ÁREAS BIEN DIFERENCIADAS Y POBREMENTE DIFERENCIADAS DE LOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES CUTÁNEOS

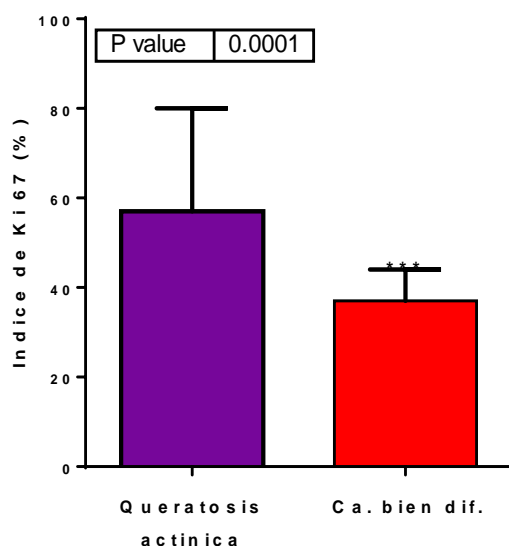


Figura 32. Comparación de la expresión de Ki 67 en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

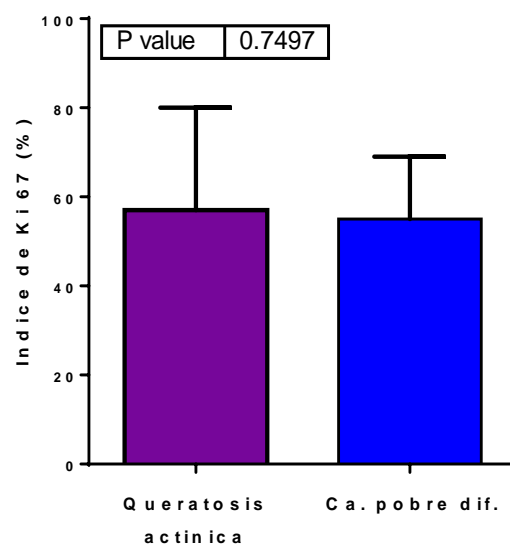


Figura 33. Comparación de la expresión de Ki 67 en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

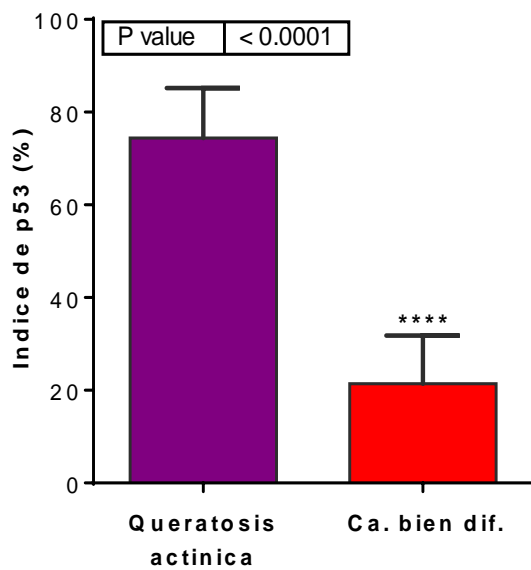


Figura 34. Comparación de la expresión de p53 en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

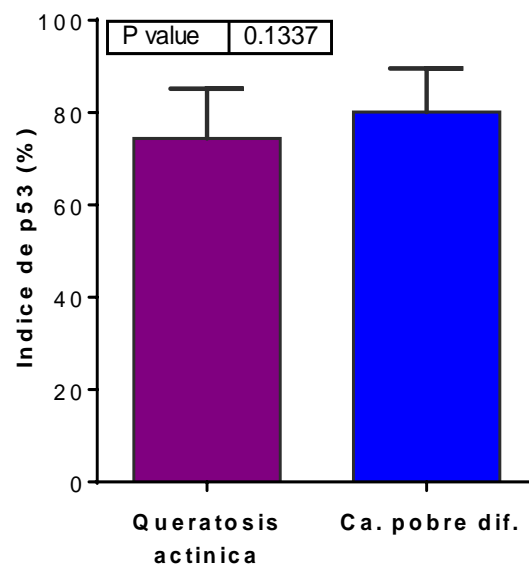


Figura 35. Comparación de la expresión de p53 en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

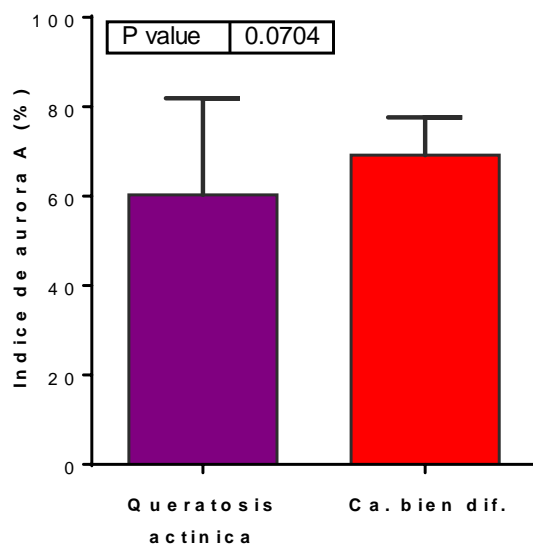


Figura 36. Comparación de la expresión de Aurora A en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

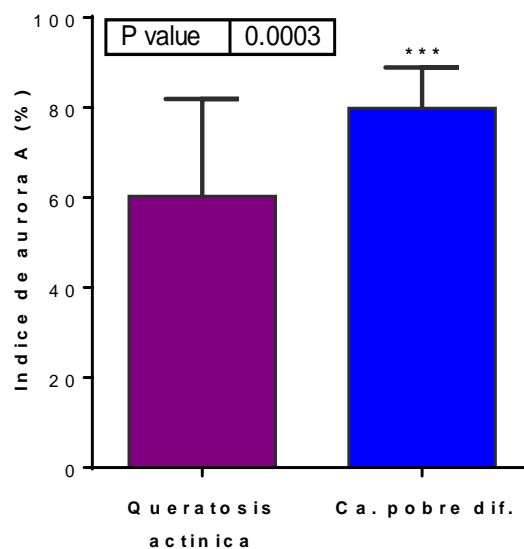


Figura 37. Comparación de la expresión de Aurora A en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

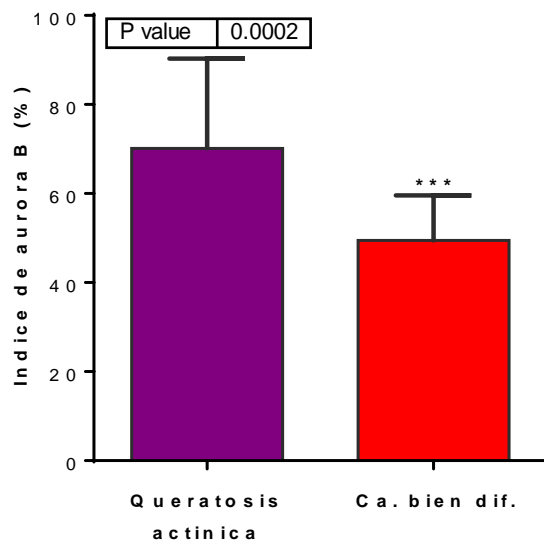


Figura 38. Comparación de la expresión de Aurora B en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

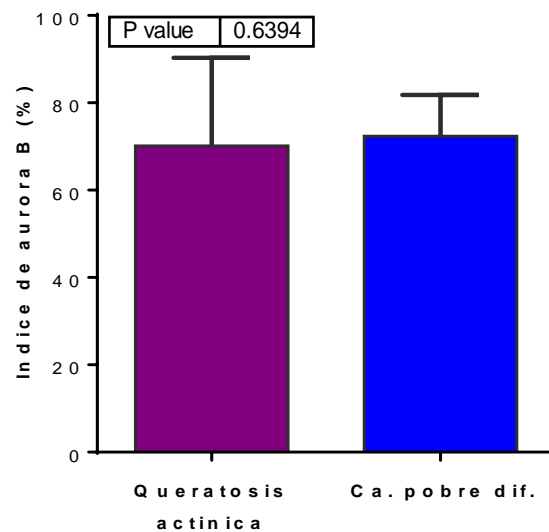


Figura 39. Comparación de la expresión de Aurora B en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

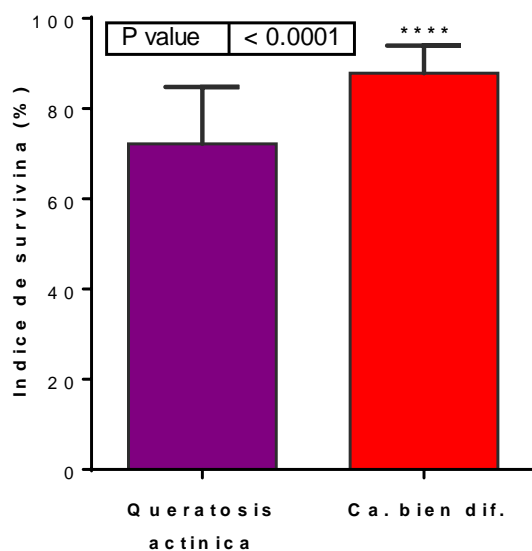


Figura 40. Comparación de la expresión de Survivina en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

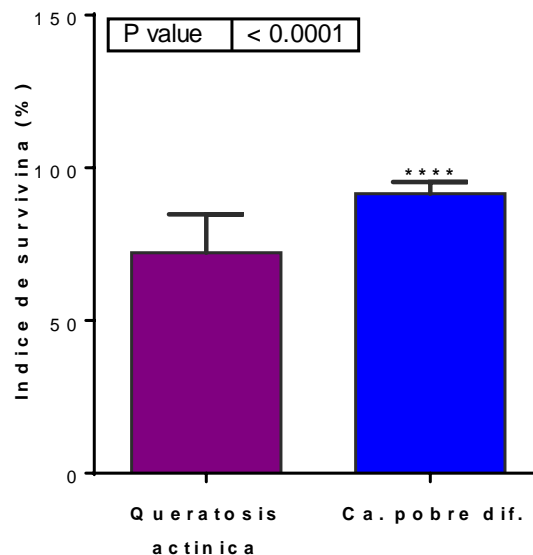


Figura 41. Comparación de la expresión de Survivina en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

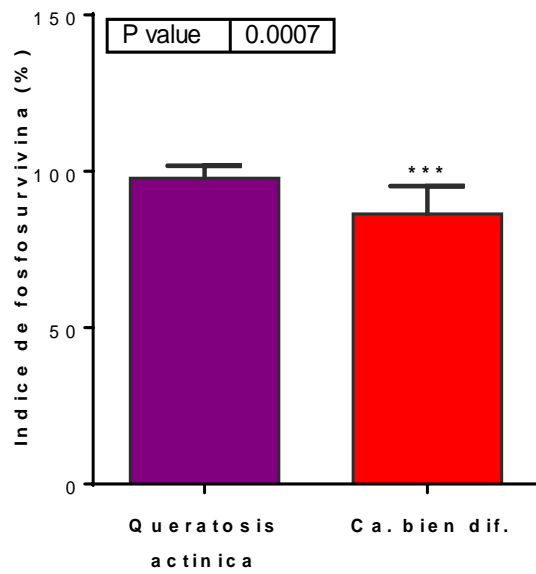


Figura 42. Comparación de la expresión de Fosfosurvivina en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas bien diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

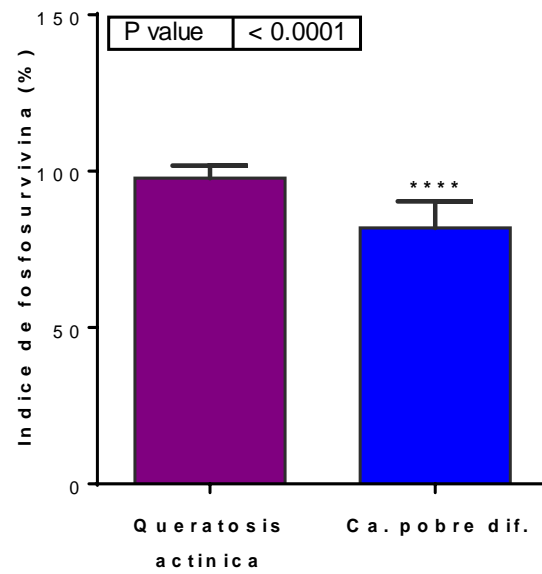


Figura 43. Comparación de la expresión de Fosfosurvivina en las Queratosis Actínicas en relación con las áreas pobremente diferenciadas de Carcinoma Epidermoide.

DISCUSIÓN

La valoración inmunohistoquímica y la cuantificación, de las moléculas reguladoras del ciclo celular de las familias de las Aurora s y Survivinas, han sido poco estudiadas en los carcinomas epidermoides (CE) cutáneos y no existe ningún trabajo que determine la expresión de Survivina y de Aurora A y Aurora B en las queratosis actínicas. Por ello, la comparación de los índices de expresión de estos marcadores en las queratosis actínicas, de una parte con respecto a la piel normal y, de otra parte, el estudio de estos marcadores moleculares en relación con la evolución de estas queratosis hacia CE, es de singular importancia en el conocimiento de la biología celular y los mecanismos implicados en la progresión de las lesiones premalignas de la piel hacia un verdadero CE infiltrante.

El estudio inmunohistoquímico de marcadores de proliferación celular¹³⁷ aporta datos valiosos en la evolución de los mecanismos biológicos y moleculares implicados en la progresión del tumor.²³ En el desarrollo o aparición de los tumores malignos están implicados los oncogenes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.^{26,129,150,190} En numerosos tipos de tumores, incluido el CE de la piel, se ha cuantificado el índice de expresión de Ki67⁶⁵ y se ha correlacionado con el grado de diferenciación celular y con la capacidad infiltrativa del tumor; también se ha cuantificado la expresión de la proteína nuclear relacionada con el oncogén p53 en relación a la progresiva desdiferenciación de los tumores epiteliales.^{11,65,109} Estudios previos sobre CE encontraron una relación directa entre el incremento de la expresión de la proteína nuclear Ki67, que está presente en todas las fases activas del ciclo celular, y la agresividad del tumor.^{65,155} Otros autores¹¹ encontraron una alta tasa de expresión de Ki67, mientras que la proteína p53 rara vez se detectaba. Looi *et al.*¹⁰⁹ estudiaron una serie de neoplasias intraepiteliales cervicales, observando relación con el índice de expresión de Ki67 pero no con la expresión de p53.

En el presente estudio, el índice de proliferación Ki67 en las áreas bien diferenciadas de CE ha sido del 37%, siendo mayor (el 55%) en las áreas pobremente diferenciadas. De hecho, en las zonas bien diferenciadas de CE el número de células Ki67 positivas mayoritariamente se visualiza en los queratinocitos basales y parabasales de los nódulos infiltrantes. Por el contrario, en las zonas pobremente diferenciadas de CE las células malignas desdiferenciadas tienen robusto marcaje Ki67 nuclear en todas las áreas del tumor.

La valoración del índice de Ki67 ha resultado útil en las lesiones displásicas y en las neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino, de modo que se vio una mayor expresión de Ki67 a medida que progresaba el grado de la lesión displásica;¹³³ así mismo, el índice de proliferación Ki67 fue mayor en las neoplasias intraepiteliales de cérvix (NIC) tipo II y tipo III y, sobre todo, en los carcinomas cervicales infiltrantes, además, en estas neoplasias cervicales, el índice Ki67 mostró una correlación con la expresión de bcl-2 pero no con la expresión de p53.¹⁰⁹

Dado que las queratosis actínicas son enfermedades cutáneas, progresivas y crónicas, que se asocian a un mayor riesgo de desarrollar un CE,¹⁵³ aunque no podemos predecir qué tipo de queratosis actínicas progresarán hacia un CE, también hemos cuantificado el índice de Ki67 en los casos de queratosis actínica, evaluando tanto las lesiones proliferativas intraepidérmicas, como aquellas áreas con nódulos queratósicos intradérmicos, asociados frecuentemente a importantes infiltrados inflamatorios, preferentemente linfocitos, en el dermis papilar.

En la evaluación del margen quirúrgico en los casos de queratosis actínicas hemos podido comprobar un incremento en la expresión intranuclear de Ki67 en los queratinocitos basales; en las glándulas sebáceas y los folículos pilosos se ha encontrado un aumento de células basales Ki67 positivas. En algunas zonas se ha encontrado displasia moderada de la epidermis con células basales y suprabasales Ki67 positivas. En las lesiones bien establecidas de queratosis actínicas, los queratinocitos displásicos mostraron un importante pleomorfismo celular con intenso marcaje nuclear de Ki67; además la cuantificación del índice Ki67 fue significativamente mayor en las series de queratosis actínicas que en las áreas bien diferenciadas de CE ($p < 0,001$). Por último, la cuantificación de los marcadores de ciclo celular en las queratosis actínicas, en relación con la piel normal, ha demostrado un índice proliferativo Ki67 del 57% en las queratosis actínicas, frente a un 3% en la piel normal.

Los nuevos tratamientos de las queratosis actínicas pretenden controlar los mecanismos biológicos que facilitan el crecimiento y la progresión infiltrativa de la lesión; por ello existen estudios que han tratado de relacionar la eficacia del tratamiento con una disminución de la proliferación celular. En este sentido, estudios previos han demostrado

que el tratamiento de las queratosis actínicas con terapia fotodinámica por luz roja y Metaminolevulinato (MAL) encontraron una reducción en la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 así como del p53, lo que indicaba una reversión del proceso carcinogénico.⁷ Así mismo, en pacientes con queratosis actínicas tratados con Diclofenaco, determinaciones inmunohistoquímicas e histopatológicas determinaron una disminución de la expresión de los marcadores Ki67 y p53, lo que demuestra el efecto antiproliferativo del Diclofenaco.³⁴

El alto índice Ki67 de las queratosis actínicas cutáneas está en consonancia con el carácter premaligno de esta lesión y con su rápido crecimiento, convirtiéndose en un verdadero CE infiltrante de la piel. Sin embargo, resulta paradójico que el índice disminuya en las zonas de CE bien diferenciado, aunque los valores de ki67 que hemos encontrado se asemejan más a los publicados previamente en otros carcinomas, incluido el cáncer de mama. Surge además el problema, aun no resuelto, de establecer un “criterio de corte” que indique qué nivel de intensidad de marcaje inmunohistoquímico de ki67 es el idóneo para considerar una célula positiva. En este sentido, hay autores que proponen establecer el punto de corte en el carcinoma de mama en un 10% de la superficie nuclear inmunomarcada,³⁸ mientras que otros proponen como valor discriminante el 20% de células Ki67 positivas;⁹³ de este modo, se han podido establecer dos grandes grupos de carcinoma de mama con pronóstico diferente: el cáncer de mama de patrón luminal A y el de patrón luminal B, recomendándose como el punto de corte el 14% de células Ki67 positivas, por encima del cual deberá ser considerado un patrón luminal B.³⁵ En definitiva, mientras más elevado sea el índice Ki-67, mayor será la fracción de células tumorales en proliferación y la agresividad del tumor, lo cual tiene relación con un peor pronóstico.^{22,35,45}

Está completamente demostrado que el p53 interviene en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis;⁴⁷ de hecho, se considera como el guardián de la integridad del genoma, porque establece la posibilidad de que las células dañadas reparen su ADN y prevengan la inestabilidad genómica.^{23,48,104,114,121,122} Cuando el gen de p53 sufre mutaciones, da lugar a una proteína anómala que no es degradada y se acumula durante un tiempo mayor, pudiendo ser detectada por métodos inmunohistoquímicos. En nuestra serie

de CE cutáneos, la expresión de p53 es intranuclear, tiene una intensidad de marcaje variable en las zonas de CE bien diferenciado y destaca la negatividad de expresión en las células escamosas planas superficiales. Sin embargo, en las áreas de CE pobremente diferenciado hemos encontrado una intensa positividad de la expresión nuclear de p53 con intenso marcaje de p53 en todo el nucleoplasma, sobre todo en las células con núcleos muy pleomórficos. En estudios previos de tumores cutáneos, el p53 se encontró expresado en todos los casos de EB, y en la mayoría de los casos de CE y, de forma moderada, en los casos de queratosis actínicas;¹⁹⁷ sin embargo, los casos de queratosis actínicas con un ligero mayor porcentaje de inmunopositividad del p53 tienen mayor probabilidad de desarrollar un CE.²⁸ En nuestra serie hemos obtenido una sobreexpresión de p53 en el 80% de las zonas en las que se encontró un patrón de CE pobremente diferenciado, mientras que en las áreas de CE bien diferenciado la expresión de p53 se redujo al 21% de las células tumorales.

En las queratosis actínicas, la proteína p53 se expresa tanto en las células basales como en las suprabasales, habiéndose encontrado zonas con un gran número de queratinocitos proliferantes con intensa expresión intranuclear de p53; además, nuestros datos cuantitativos han demostrado que la expresión de p53 ocurre en el 74% de los núcleos de las zonas con lesiones de queratosis actínica, frente a un 19% en la piel normal de los bordes quirúrgicos de la lesión. La expresión de la proteína p53 es muy alta en las queratosis actínicas, tanto en las lesiones epidérmicas como en los casos de invasión dérmica.

La comparación del número de células p53 positivas, demuestran unos valores similares en las queratosis actínicas cuando se comparan con las áreas de CE pobremente diferenciado; sin embargo, el número de células p53 positivas es significativamente mayor ($p < 0,0001$) en las queratosis actínicas que en las zonas de CE bien diferenciado.

Dado que las queratosis actínicas hipertróficas se asocian más frecuentemente a la progresión a CE, es verosímil pensar que la disminución de la expresión de p53 en las queratosis actínicas comunes indica una mayor probabilidad de progresión a CE;¹³⁶ además, en el presente estudio se ha encontrado una alta significación estadística ($p < 0,0001$) cuando se comparan los elevados índices de Ki67 y p53 en las queratosis actínicas con respecto a la expresión de estos dos epítomos en la epidermis normal.

En el estudio de moléculas relacionadas con la proliferación celular y el crecimiento de los tumores malignos es muy útil valorar, además de los marcadores clásicos de ciclo celular, Ki67 y p53, las moléculas de la familia de las Aurora quinasas A y B y la Survivina.^{37,51,66-68,73,82,186,202} Se sabe que la Aurora A, codificada por el gen STK-15, localizado en la región cromosómica (20q13), se encuentra amplificado en diversas neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de mama, de ovario y de endometrio;^{24,119,120,129,176,201} La Aurora A es clave en la vía de regulación de p53, y estudios previos demuestran que la elevada expresión de Aurora A fosforila a p53 e incrementa su degradación, facilitando de este modo la transformación oncogénica.⁹⁶

En nuestra serie de CE, la Aurora A se expresó en el 69% de las células de las áreas de CE bien diferenciado, frente al 80% en el caso de zonas de CE pobremente diferenciado. La tinción de la proteína fue nuclear, aunque con menor intensidad de marcaje en las áreas de CE bien diferenciado, si se compara con el robusto marcaje nuclear de las zonas de CE pobremente diferenciado. Estudios previos acerca de la expresión de Aurora A en los cánceres cutáneos son muy escasos y poco concluyentes; contrariamente, la expresión de Aurora A se ha estudiado muy bien en neoplasias de células escamosas, incluidas las neoplasias intraepiteliales del cérvix uterino y en el carcinoma cervical.^{177,200} En ambos tipos de lesiones cervicales, la Aurora A mostró principalmente un patrón de tinción nuclear, pero la inmunoexpresión fue negativa en el cérvix normal.¹⁷⁷ En los casos de neoplasias intraepiteliales tipo III y en los carcinomas escamosos cervicales, la expresión de Aurora A se encontró, respectivamente, en el 37% y en el 50% de los casos, pero la tinción nuclear preferentemente fue débil o moderada.

La expresión de Aurora B ha sido menos estudiada en las neoplasias malignas. En el presente estudio hemos cuantificado expresión intranuclear de Aurora B en el 48% de las células tumorales de las áreas con CE bien diferenciado, frente al 72% en los campos microscópicos con CE pobremente diferenciado. Estos datos están en consonancia con los datos de la expresión de Aurora B en neoplasias de cérvix uterino en las que se ha encontrado un incremento de la expresión en los carcinomas escamosos infiltrantes (56%) con respecto a la observada en las neoplasias intraepiteliales cervicales (38,2%);¹⁷⁷ asimismo

también se ha observado una intensa expresión nuclear de Aurora B en los carcinomas de ovario.¹¹⁹ En definitiva, en nuestro estudio de CE cutáneos, frente al intenso marcaje intranuclear de la Aurora A y de la Aurora B, en general la mayoría de los citoplasmas de las células malignas no tienen inmunomarcaje, salvo algunas células disqueratósicas tumorales, en cuyo citoplasma se puede identificar inmunomarcaje, tanto cuando se usan anticuerpos anti-Aurora A como con anticuerpos anti-Aurora B.

En el presente trabajo también se procedió a cuantificar la expresión de Aurora A y de Aurora B en los casos de queratosis actínicas, ya que en nuestro conocimiento no existen trabajos previos que exploren estas moléculas de la familia de Aurora quinasas en esta lesión premaligna cutánea. En las queratosis actínicas, el índice de expresión nuclear de Aurora A fue del 60%, mientras que en la piel normal el número de núcleos Aurora A positivos fue del 9%. En un caso característico de queratosis actínica activada, los núcleos de todas las células del estrato escamoso, estrato granuloso y células planas más superficiales presentaban intenso inmunomarcaje de Aurora A. Aún mayor ha sido el porcentaje de núcleos positivos de Aurora B (70%) en las lesiones de queratosis actínicas, frente al 11% en la piel normal. La distribución de la Aurora A en la epidermis normal fue fundamentalmente en los queratinocitos basales, mientras que el inmunomarcaje fue notoriamente menor, e incluso negativo, en el estrato escamoso y en las células con diferenciación escamosa. Contrariamente, en nuestros casos el índice de células Aurora B positivas fue alto, tanto en las basales, como en las parabasales y en las del estrato escamoso.

En relación con las moléculas reguladoras del ciclo celular también hemos explorado en los CE cutáneos moléculas de la familia de las Survivinas, concretamente hemos valorado el inmunomarcaje en las células tumorales de Survivina y de su forma mutada: la Fosfosurvivina. Está completamente establecido que la Survivina, proteína inhibidora de la apoptosis, es esencial para la homeostasis tisular y el mantenimiento de la viabilidad de las células madre en modelos experimentales de cáncer de mama;^{47,102} así mismo, cuando se suprime la expresión de Survivina, además de inducir apoptosis, se incrementa la capacidad de sensibilizar al tumor frente a la quimioterapia.⁷⁴ En conclusión, en las células normales del adulto sano el gen de la Survivina se encuentra desactivado, pero en las células tumorales

este gen se reactiva y permite a la célula escapar de los mecanismos de control y dividirse libremente.^{4,132,188}

En todos nuestros casos de CE se ha detectado expresión de Survivina, tanto en núcleos como en citoplasmas, y la sobreexpresión citoplasmática se incrementa en las células tumorales con diferenciación escamosa y en los globos córneos. Se ha encontrado una diferencia significativamente mayor en el número de núcleos Survivina positivos en las áreas de CE pobremente diferenciado. Estos datos morfológicos ya han sido ampliamente estudiados en otras neoplasias, habiéndose afirmado que la expresión de Survivina se incrementa significativamente en el citosol y en las membranas citoplasmáticas de las células transformadas.¹⁴⁴ Los estudios cuantitativos realizados han demostrado una expresión de Survivina del 88% en las zonas bien diferenciadas de CE frente al 92% de las áreas pobremente diferenciadas. Asimismo, se ha encontrado un índice de expresión de Fosfosurvivina del 86% en las zonas bien diferenciadas de CE, mientras que en las pobremente diferenciadas se encontró un 82%. Estos altos índices de expresión nuclear de Survivina en las áreas de CE pobremente diferenciado pueden relacionarse con una posible translocación de esta molécula desde el citoplasma al núcleo de la célula tumoral, tal como previamente se ha sugerido en varios tipos de tumores epiteliales y mesenquimales, sobre todo de las lesiones de alto grado, y también en tumores malignos de células germinales del testículo.²¹ Esta translocación nuclear de Survivina se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.

El aumento de expresión intranuclear de Survivina ocurre también en lesiones premalignas de epitelio escamoso. La Survivina se expresa en hiperplasias y neoplasias de queratinocitos epidérmicos,^{27,28,75} y además, en muchos tumores cutáneos la expresión de la Survivina se asocia con la expresión de p53 y p63.¹⁴³

En los carcinomas de la cavidad oral y en sus lesiones precursoras premalignas se ha publicado una inmunorreactividad positiva de Survivina, identificándose en el 72% de los carcinomas orales y en el 44% de las lesiones premalignas.⁹⁸ La Survivina se ha detectado en lesiones preneoplásicas de la piel, tales como la enfermedad de Bowen, las queratosis actínicas y los poroqueratomas.⁷⁵

En las queratosis actínicas la inmunoexpresión de Survivina es más evidente en la capa basal del epitelio queratósico. Todos estos datos indican que la Survivina tiene un cierto papel en el desarrollo del carcinoma cutáneo y un papel en la inhibición de los mecanismos de la homeostasis epidérmica.⁴⁴

En nuestra serie se cuantificó la expresión de Survivina en los casos de queratosis actínicas, obteniendo unos valores del 72% frente al 20% de la piel normal. Del mismo modo, en lo referente a la Fosfosurvivina encontramos un 98% en casos de queratosis y un 37% en piel normal.

En el estudio se encontró que la Survivina se expresa en el núcleo y en el citoplasma de las células basales. A medida que se encuentra un mayor grado de queratinización, se va perdiendo la expresión de Survivina intracitoplásmica del estrato escamoso. Con referencia a la molécula de Fosfosurvivina, ocurre algo similar: la intensidad de expresión citoplásmica es inversa al aumento de la queratinización de las células displásicas de la queratosis actínica.

Podemos decir pues que el índice de expresión nuclear de Survivina es significativamente mayor ($p < 0.0001$) en las queratosis actínicas que en la piel normal; también es mayor el índice de expresión nuclear de Fosfosurvivina que el encontrado en la piel normal ($p < 0.005$)

Relacionándose la expresión elevada de los niveles de Survivina con el mayor riesgo de muerte en los pacientes con carcinoma de células claras. Pero además, en varios tumores epiteliales y mesenquimales e incluso en tumores malignos de testículo,²¹ se ha descrito una localización nuclear de la Survivina, sobre todo en las lesiones de alto grado, sugiriendo que existe una translocación nuclear de esta proteína, la cual se interpreta como un proceso temprano en la transformación maligna.

Por lo que respecta a los datos encontrados en nuestro estudio en referencia a la molécula de la Fosfosurvivina, ésta se expresa intensamente en el núcleo de las células tumorales malignas, de forma tenue en el citoplasma de las células disqueratósicas, y el inmunomarcaje está ausente en las células pobremente diferenciadas. El número de núcleos

que tienen expresión de Fosfosurvivina es ligeramente menor ($p<0.05$) en las áreas pobremente diferenciadas de CE.

La expresión intranuclear de Survivina es significativamente mayor ($p<0.0005$) tanto en las áreas bien diferenciadas como en las pobremente diferenciadas de los CE cuando se comparan con nuestros casos de queratosis actínicas. Contrariamente, el índice de Fosfosurvivina es significativamente mayor en los casos de queratosis actínicas que en los dos grados de diferenciación de los CE cutáneos estudiados por nosotros.

En definitiva, la expresión de Survivina en los carcinomas se asocia a unas características histológicas desfavorables y a una peor supervivencia y se ha publicado aumento de la inmunoexpresión de Survivina en neoplasias malignas de distintas localizaciones.^{75,91,97,112,128,139,172,175,198}

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los índices de expresión nuclear de Ki67 y de p53 son significativamente mayores en las zonas con carcinoma epidermoide cutáneo pobremente diferenciado que en las áreas de carcinoma epidermoide bien diferenciado.

SEGUNDA. En las células de los carcinomas epidermoides cutáneos se evidencia una intensa inmunoexpresión nuclear de Aurora A y Aurora B. El número de núcleos Aurora A y Aurora B positivos es significativamente mayor ($p<0.0001$) en las zonas pobremente diferenciadas, en comparación con las zonas bien diferenciadas de los carcinomas epidermoides.

TERCERA. En todos los carcinomas epidermoides cutáneos se ha detectado expresión nuclear y citoplásmica de Survivina. El número de núcleos survivina positivos es significativamente mayor en las zonas de carcinoma epidermoide pobremente diferenciado, en comparación con las zonas bien diferenciadas.

CUARTA. La Fosfosurvivina se expresa intensamente en los núcleos de las células de los carcinomas epidermoides; contrariamente, el inmunomarcaje es tenue en el citoplasma de las células disqueratósicas y está ausente en las células pobremente diferenciadas. El número de núcleos que expresan Fosfosurvivina es ligeramente menor ($p<0.05$) en las zonas pobremente diferenciadas de los carcinomas epidermoides, con respecto a las áreas bien diferenciadas.

QUINTA. El índice de Ki67 y de p53 de las queratosis actínicas es semejante al cuantificado en las áreas de carcinoma epidermoide pobremente diferenciado y significativamente mayor con respecto al obtenido en las zonas bien diferenciadas de carcinoma epidermoide ($p<0.0001$).

SEXTA. El número de células Aurora A positivas es significativamente menor en las queratosis actínicas que en las zonas de carcinoma epidermoide pobremente diferenciado. La expresión nuclear de Aurora B es significativamente mayor en las queratosis actínicas, en comparación con las zonas de carcinoma epidermoide bien diferenciado. No se ha

encontrado significación con respecto a las áreas de carcinoma epidermoide pobremente diferenciado.

SÉPTIMA. La expresión de Survivina es significativamente menor en las queratosis actínicas que en las áreas bien y pobremente diferenciadas de carcinoma epidermoide ($p < 0.0001$). El índice de Fosfosurvivina es significativamente mayor en las queratosis actínicas que el encontrado en los dos grados de diferenciación de los carcinomas epidermoides cutáneos.

RESUMEN

El estudio de las moléculas reguladoras del ciclo celular de la familia Aurora quinasas y de la familia de Survivina se ha realizado en numerosos tumores y los datos obtenidos se han correlacionados con los marcadores clásicos de proliferación celular, incluidos el índice de Ki67 y la expresión del oncogén p53: Sin embargo, la evaluación inmunohistoquímica de estas moléculas, incluidas Aurora A, Aurora B, Survivina y Fosfosurvivina, han sido escasamente exploradas en los carcinomas epidermoides (CE) cutáneos, y, en nuestro conocimiento, no han sido cuantificadas en lesiones premalignas de queratosis actínicas.

En la presente Tesis se compara la cuantificación de la expresión nuclear inmunohistoquímica de Aurora A, Aurora B, Survivina y Fosfosurvivina en las áreas de CE bien diferenciados con respecto al índice de estos marcadores en las áreas de CE pobremente diferenciado. En el grupo de casos con queratosis actínica se evalúan los índices de estos marcadores con el patrón de expresión de la epidermis normal de los bordes quirúrgicos y con los dos grados histopatológicos de las áreas bien y pobremente diferenciadas del CE.

Los datos cuantitativos demuestran un significativo mayor número de núcleos Aurora A y Aurora B positivos en las áreas de CE pobremente diferenciadas que en las bien diferenciadas. También la expresión de Survivina es superior en las zonas con pobre diferenciación, pero contrariamente la expresión de Fosfosurvivina es ligeramente mayor en el patrón bien diferenciado del CE.

En las queratosis actínicas, el número de células Aurora A y Aurora B positivas es mucho mayor que en la epidermis normal; sin embargo, el alto número de núcleos Aurora A positivos en las queratosis actínicas no llega a alcanzar los altos valores encontrados en las áreas de CE bien diferenciado. Contrariamente la cuantificación de núcleos Aurora B positivos demuestra un significativo mayor número en las queratosis actínicas que en las zonas bien diferenciadas los CE, no habiendo encontrado significación cuando se compara con los patrones de CE pobremente diferenciado.

En las lesiones intradérmicas de queratosis actínicas, la expresión de Survivina y Fosfosurvivina es significativamente mayor que en la epidermis normal; además, el alto índice de Survivina observado en las lesiones queratósicas es significativamente menor cuando se compara con los dos patrones bien y pobremente diferenciados de CE. La cuantificación de Fosfosurvivina de las queratosis actínicas demuestra índices significativamente mayores que los obtenidos en los dos tipos de CE cutáneos.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren un comportamiento diferente de estas moléculas reguladoras del ciclo celular en las lesiones premalignas cutáneas de queratosis actínicas y en los dos tipos bien diferenciado y pobremente diferenciado de CE. Además, estos datos inmunohistoquímicos y cuantitativos pudieran tener relación con el diferente comportamiento biológico y con el pronóstico de estos tumores cutáneos.

Palabras Clave: Carcinoma Epidermoide, Tumores Cutáneos, Queratosis Actínica, Aurora A, Aurora B, Survivina y Fosfosurvivina.

SUMMARY

Regulating proteins of the cellular cycle related to Aurora Kinase and Survivin have been studied in different tumors, and have been correlated with the most common proliferation cell markers, including Ki67 index and the p53 oncogene expression. However, immunohistochemical evaluation of these proteins, including Aurora A, Aurora B, Survivin and Phospho-Survivin, have been scarcely explored in Squamous Cell Carcinoma (SCC). As far as we know, these proteins have not been quantified in premalignant skin lesions, such as Actinic Keratoses.

This Thesis research compares the quantification of immunohistochemical nuclear expression of Aurora A, Aurora B, Survivin and Phospho-Survivin in the areas with well-differentiated SCC pattern regarding to the level of these markers in areas affected with poorly-differentiated SCC. In the Actinic Keratoses cases, levels of these markers were compared with those observed in the surgical borders containing normal epidermis, as well as with the two histopathological well and poorly-differentiated grades of SCC.

Quantitative data show a higher number of positive Aurora A and Aurora B cells in poorly-differentiated SCC areas than in well-differentiated pattern of SCC. Survivin expression is also higher in poorly-differentiated tumors. On the contrary, Phospho-Survivin expression is slightly higher in the well-differentiated SCC pattern.

The number of positive Aurora A and Aurora B cells is much higher in Actinic Keratoses than in normal epidermis. Nevertheless, the amount of Aurora A in Actinic Keratoses does not reach the high levels found in the areas of well-differentiated SCC. On the contrary, quantification of positive Aurora B nuclei shows a significant higher level in Actinic Keratoses than observed in the well-differentiated SCC pattern; however, levels of Aurora B index were similar in Actinic Keratoses compared with obtained in areas of poorly-differentiated SCC.

In intradermal lesions of Actinic Keratoses, Survivin and Phospho-Survivin expression is significantly higher than in normal epidermis; and the high level of Survivin in the Actinic Keratoses is significantly lower when comparing with well and poorly-differentiated patterns of SCC. Quantification of Phospho-Survivin in Actinic Keratoses shows significantly higher levels than the results obtained from both types of cutaneous SCC.

The data available in this research suggest a different behaviour of regulating proteins of the cellular cycle in cutaneous premalignant Actinic Keratoses lesions and in both well-differentiated and poorly-differentiated areas of SCC. Additionally, this immunohistochemical and quantitative data might have correlated with the different biological behaviour and with prognosis of this cutaneous tumors.

Key Words: Squamous Cell Carcinoma, Skin Tumors, Actinic Keratoses, Aurora A, Aurora B, Survivin and Phospho-Survivin.

REFERENCIAS

1. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001; 344: 975-983.
2. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. P53-Mdm2—The affair that never ends. *Carcinogenesis* 2002; 23: 541-547.
3. Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 447-452.
4. Andersen MH, Thor SP. Survivin-a universal tumor antigen. *Histol Histopathol* 2002; 17: 669-675.
5. Argenyi ZB, Nguyen AV, Balogh K, Sears JK, Whitaker DC. Malignant eccrine spiradenoma. A clinicopathologic study. *Am J Dermatopathol* 1992; 14: 381-390.
6. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368-1383.
7. Bagazgoitia L, Cuevas Santos J, Juarranz A, Jaén P. Photodynamic therapy reduces the histological features of actinic damage and the expression of early oncogenic markers. *Br J Dermatol* 2011; 165: 144-151.
8. Balmain A, Brown K. Oncogene activation in chemical carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1988; 51: 147-182.
9. Bánkfalvi A, Ludwig A, De-Hesselle B, Buerger H, Buchwalow IB, Boecker W. Different proliferative activity of the glandular and myoepithelial lineages in benign proliferative and early malignant breast diseases. *Mod Pathol* 2004; 17: 1051-1061.
10. Banks ER, Cooper PH. Adenosquamous carcinoma of the skin. A report of 10 cases. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 227-234.
11. Bar JK, Harlozinska A, Markowska J, Nowak M. Studies on tumor proliferation using monoclonal antibody, Ki-67 and expression of p53 in cancer of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1996; 17: 378-380.
12. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-782.
13. Barrera MV, Herrera E. Topical chemotherapy for actinic keratosis and nonmelanoma skin cancer: current options and future perspectives. *Actas Dermosifiliogr* 2007; 98: 556-562.
14. Barrett JC, Hesterberg TW, Thomassen DG. Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 1984; 36: 53s-70s.
15. Basal cell and squamous cell skin cancers. Clinical practice guidelines in oncology. National Comprehensive Cancer Network Basal Cell and Squamous Cell Skin Cancers. *J Natl Compr Canc Netw* 2004; 2: 6-27.
16. Basset-Seguín N, Dereure O, Guillot B. Genetic bases of cutaneous tumors. *Ann Dermatol Venereol* 1995; 122: 217-225.
17. Bayketin F, Tuna B, Mungan U, Aslan G, Yorukoglu K. Significance of P-glycoprotein, p53 and survivin expression in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2011; 29: 502-507.
18. Bellamy COC, Malcomson RDG, Harrison DJ. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 3-16.

19. **Bennett RD, Pittelkow MR, Strehler EE.** Immunolocalization of the tumor-sensitive calmodulin-like protein CALML3 in normal human skin and hyperproliferative skin disorders. *PLoS One* 2013; 8: e62347.
20. **Berman B, Cockerell CJ.** Pathobiology of actinic keratosis: ultraviolet-dependent keratinocyte proliferation. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68 (1 Suppl 1): S10-9.
21. **Berney DM, Warren AY, Verma M, Kudahetti S, Robson JM, Williams MW, Neal DE, Powles T, Shamash J, Oliver RT.** Malignant germ cell tumours in the elderly: a histopathological review of 50 cases in men aged 60 years or over. *Mod Pathol* 2008; 21: 54-59.
22. **Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, Dabb DJ.** Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 2: 444-455.
23. **Biermann K, Heukamp LC, Steger K, Zhou H, Franke FE, Sonnack V, Brehm R, Berg J, Bastian PJ, Muller SC, Wang-Eckert L, Buettner R.** Genome-wide expression profiling reveals new insights into pathogenesis and progression of testicular germ cell tumors. *Cancer Genomics Proteomics* 2007; 4: 359-367.
24. **Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD.** A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 1998; 17: 3052-3065.
25. **Bishop JM.** Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-248.
26. **Blázquez MJ, Regadera J, Mariño J, Newman RE, Notario V.** Gradual deregulation and loss of PCPH expression in the progression of human laryngeal neoplasia. *Mol Carcinog* 2002; 35: 186-195.
27. **Bowen AR, Hanks AN, Allen SM, Alexander A, Diedrich MJ, Grossman D.** Apoptosis regulators and responses in human melanocytic and keratinocytic cells. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 48-55.
28. **Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, Florell SR, Grossman D.** Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am J Dermatopathol* 2004; 26: 177-181.
29. **Brantsch KD, Meisner C, Schöfisch B, Trilling B, Wehner-Caroll J, Röcken M.** Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 713-720.
30. **Brash DE, Ziegler A, Honason AS.** Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 136-142.
31. **Canesin G, Gonzalez-Peramato P, Palou J, Urrutia M, Cerdón-Cardo C, Sánchez-Carbayo M.** Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome. *Tumour Biol* 2010; 31: 277-285.
32. **Cartun RW, Pedersen CA.** An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. *J Histotechnol* 1989; 12: 273-279.
33. **Cattoretti G, Suurmeijer AJH.** Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anat Pathol* 1995; 2: 2-9.

34. Çayirli M, Köse O, Demiriz M. Clinical, dermoscopic and immunohistochemical assessment of actinic keratoses and evaluation of the effectiveness of diclofenac therapy with immunohistochemical analysis. *Arch Dermatol Res* 2013; 305: 389-395.
35. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 736-750
36. Chen SS, Chang PC, Cheng YW, Tang FM, Lin YS. Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a trans-activation-independent p53 function. *EMBO J* 2002; 21: 4491-4499.
37. Chieffi P, Troncone G, Caleo A, Libertini S, Linardopoulos S, Tramontano D, Portella G. Aurora B expression in normal testis and seminomas. *J Endocrinol* 2004; 181: 263-270.
38. Choi YL, Oh E, Park S, Kim Y, Park YH, Song K, Cho EY, Hong YC, Choi JS, LeeJE, Kim JH, Nam SJ, Im YH, Yang JH, Shin YK. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. *BMC Cancer* 2010; 10: 507.
39. Chu JS, Shew JY, Huang CS. Immunohistochemical analysis of survivin expression in primary breast cancers. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 925-931.
40. Civatte J. Pseudo-carcinomatous hyperplasia. *J Cutan Pathol* 1985; 12: 214-223.
41. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J. Am Acad Dermatol* 2000; 42 (1pt.2): 11-17.
42. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 2000; 96: 4002-4003.
43. Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 874-885.
44. Dallaglio K, Petrachi T, Marconi A, Truzzi F, Lotti R, Saltari A, Morandi P, Puviani M, Maiorana A, Pincelli C. Expression of nuclear survivin in normal skin and squamous cell carcinoma: a possible role in tumour invasion. *Br J Cancer* 2014; 110: 199-2017.
45. De Azambuja E, Cardoso F, De Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12155 patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1504-1513.
46. D'Errico M, Calcagnile AS, Corona R. p53 mutations and chromosome instability in basal cell carcinomas developed at an early or late age. *Cancer Res* 1997; 57: 747-752.
47. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117-129. Erratum in: *Nat Genet* 2001;29:351.
48. Di Paolo JA. Relative difficulties in transforming human and animal cells in vitro. *J Natl Cancer Ins* 1983; 70: 3-8.
49. Di Paolo JA, Woodworth CD, Popescu NC, Notario V, Doniger J. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. *Oncogene* 1989; 4: 395-399.
50. Dixon AY, Lee SH, McGregor DH. Histologic features predictive of basal cell carcinoma recurrence. Results of a multivariate analysis. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 137-142.

-
51. Dutertre S, Descamps S, Prigent C. On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene* 2002; 21: 6175-6183.
 52. Eguchi Y, Srivanasan A, Tomaselli KJ, Shimizu S, Tsujimoto Y. ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res* 1999; 59: 2174-2181.
 53. Euvrard S, Chardonnet Y, Pouteil-Noble C, Kanitakis J, Chignol M, Trhivolet J, Touraine J. Association of skin malignancies with various and multiple carcinogenic and noncarcinogenic human papilloma viruses in renal transplant recipients. *Cancer* 1993; 72: 2198-2206.
 54. Farasat S, Yu SS, Neel VA, Nehal KS, Lardaro T, Mihm MC. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous-cell carcinoma: Creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: 1051-1059.
 55. Faulkner SW, Friedlander ML. Microsatellite instability in germ cell tumors of the testis and ovary. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 38-43.
 56. Feldman SR, Fleischer AB Jr. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma revisited: clinical and treatment implications. *Cutis* 2011; 87: 201-207.
 57. Firnhaber JM. Diagnosis and treatment of basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician* 2012; 86: 161-168.
 58. Fleming ID, Amonett R, Monaghan T, Fleming MD. Principles of management of basal and squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer* 1995; 75: 699-704.
 59. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 1-10.
 60. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Fincham S, McLean DI, Threlfall WJ. Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1995; 131: 164-169.
 61. García-Fernández E, De Diego JI, Collantes-Bellido E, Mendiola M, Prim MP, Pérez-Fernández E, Miguel-Martín M, Nistal M, Hardisson D. Aurora B kinase expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its prognostic implications. *Histopathology* 2011; 58: 368-376.
 62. García-Zuazaga J, Olbricht SM. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *Adv Dermatol* 2008; 24: 33-57.
 63. Garven TC, Thelmo WL, Victor J, Pertschuk L. Verrucous carcinoma of the leg positive for human papillomavirus DNA 11 and 18. A case report. *Hum Pathol* 1991; 22: 1170-1172.
 64. Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 139-147.
 65. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 199-206.
 66. Giet R, McLean D, Descamps S, Lee MJ, Raff JW, Prigent C, Glover DM. Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J Cell Biol* 2002; 156: 437-451.
 67. Giet R, Uzbekov R, Cubizolles F, Le Guellec K, Prigent C. The *Xenopus laevis* Aurora-related Protein Kinase pEg2 Associates with and Phosphorylates the Kinesin-related Protein XIEg5. *J Biol Chem* 1999; 274: 15005-15013.

-
68. Gilaberte Y, Milla L, Salazar N, Vera-Alvarez J, Kourani O, Damian A, Rivarola V, Roca MJ, Espada J, González S, Juarranz A. Cellular Intrinsic Factors Involved in the Resistance of Squamous Cell Carcinoma to Photodynamic Therapy. *J Invest Dermatol* 2014 Apr 9. doi: 10.1038/jid.2014.178.
 69. González-Peramato P, Jiménez-Heffernan JA, Vicandi B, López-Ferrer P, Bárcena C, Álvarez-Rodríguez F, Picazo ML, Viguer JM. Micropapillary Carcinoma of the Urinary Tract: A Cytologic Study of Urine and Fine-Needle Aspirate Samples. *Acta Cytol* 2014. [Epub ahead of print].
 70. González-Peramato P, Regadera J, Juarranz A. Terapia Fotodinámica en Urología. Mecanismo de acción biológicos y patológicos. *Arch Esp Urol* 2008; 61: 1135-1144.
 71. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch Dermatol* 1997; 133: 735-740.
 72. Greenhalgh DA, Wang X-J, Roop DR. Multistage epidermal carcinogenesis in transgenic mice: Cooperativity and paradox. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 162-176.
 73. Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, Yang L, Sun M, Shelley SA, Fiorica JV, Nicosia SV, Cheng JQ. Activation and Overexpression of Centrosome Kinase BTAK/Aurora-A in Human Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1420-1426.
 74. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12:11-19.
 75. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* 1999; 79: 1121-1126.
 76. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, surviving, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1076-1081.
 77. Haitel A, Wiener HG, Baethge U, Marberger M, Susani M. Mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1840-1844.
 78. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
 79. Herzborg AJ, Garcia JA, Kerns BJ, Jordan PA, Pence JC, Rotter SM, Dzubrow LM. DNA ploidy of basal cell carcinoma determined by image cytometry of fresh smears. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 216-222.
 80. Heyderman, E, Graham RM, Chapman DV, Richardson TC, McKee PH. Epithelial markers in primary skin cancer. An immunoperoxidase study for the distribution of epithelial membrane antigen (EMA) and carcinoembryonic antigen (CEA) in 65 primary skin carcinomas. *Histopathology* 1984; 8: 423-434.
 81. Hinnis AR, Lockett JC, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 639-645.
 82. Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 2003; 114: 585-598.
 83. Hockenberry DM. Defining apoptosis. *Am J Dermatopathol* 1995; 146: 16-19.

-
84. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic surviving gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 3247-3257.
 85. Hofmockel G, Wittmann A, Dammrich J, Bassukas ID. Expression of p53 and Bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no evidence for prognostic significance. *Anticancer Res* 1996; 16: 3807-3811.
 86. Honda R, Körner R, Nigg EA Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 3325-3341.
 87. Howle JR, Morgan GJ, Kalnins I, Palme CE, Veness MJ. Metastatic cutaneous squamous-cell carcinoma of the scalp. *ANZ J Surg* 2008; 78: 449-453.
 88. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-580.
 89. Imayama S, Yashima Y, Higuchi R, Urabe H. A new concept of basal cell epitheliomas based on the three-dimensional growth pattern of the superficial multicentric type. *Am J Pathol* 1987; 128: 497-504.
 90. Iorio ML, Ter Louw RP, Kauffman CL, Davison SP. Evidence-based medicine: facial skin malignancy. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132: 1631-1643.
 91. Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085.
 92. Izaki S, Hirai A, Yoshizawa Y, Kitamura K, Inoue T, Hatoko M, Itoyama S, Inazu M. Carcinosarcoma of the skin. Immunohistochemical and electron microscopic observations. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 272-278.
 93. Jacquemier J, Charafe-Jauffret E, Monville F, Esterni B, Extra JM, Houvenaeghel G, Xerri L, Bertucci F, Birnbaum D. Association of GATA3, P53, Ki67 status and vascular peritumoral invasion are strongly prognostic in luminal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009; 11: R23.
 94. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 467-484.
 95. Kao GF, Graham JH, Helwig EB. Carcinoma cuniculatum (verrucous carcinoma of the skin): A clinicopathologic study of 46 cases with ultrastructural observations. *Cancer* 1982; 49: 2395-2402.
 96. Katayama H, Sasai K, Kawai H, Yuan ZM, Bondaruk J, Suzuki F, Fujii S, Arlinghaus RB, Czerniak BA, Sen S. Phosphorylation by Aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet* 2004; 36: 55-62.
 97. Kawasaki h, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by surviving predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074.
 98. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, Bisen PS. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009; 31: 1039-1048.
 99. Krag Jacobsen G, Barlebo H, Olsen J, Schultz HP, Starklint H, Sogaard H, Vaeth M. Testicular germ cell tumours in Denmark 1976-1980. Pathology of the 1058 consecutive cases. *Acta Radiol Oncol* 1984; 23: 239-247.

100. Lagler CN, Freitag SK. Management of periocular actinic keratosis: a review of practice patterns among ophthalmic plastic surgeons. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 2012; 28: 277-281.
101. Lairmore TC, Norton JA. Advances in molecular genetics. *Am J Surg* 1997; 173: 37-41.
102. Lee CW, Simin K, Liu Q, Plescia J, Guha M, Khan A, Hsieh CC, Altieri DC. A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R97.
103. Lehner R, Lucia MS, Jarboe EA, Orlicky D, Shroyer AL, McGregor JA, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem* 2002; 10: 134-138.
104. Levine AJ, Prerry ME, Chang A. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 69: 409-416.
105. Lewis KG, Weinstock MA. Nonmelanoma Skin Cancer Mortality (1988-2000): The Rhode Island Follow-back study. *Arch Dermatol* 2004. 140: 837-842.
106. Liang SB, Ohtsuki Y, Furihata M, Takeuchi T, Iwata J, Chen BK, Sonobe H. Sun-exposure- and aging-dependent p53 protein accumulation results in growth advantage for tumour cells in carcinogenesis of nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch* 1999; 434: 193-199.
107. Lober BA, Lober CW. Actinic keratosis is squamous cell carcinoma. *South Med J* 2000; 93: 650-655.
108. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1069-1080.
109. Looi ML, Dali AZ, Ali SA, Ngah WZ, Yusof YA. Expression of p53, bcl-2 and Ki-57 in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Anal Quant Cytol Histol* 2008; 30: 63-70.
110. Lopes De Faria J, Navarrete MA. The histopathology of the skin basal cell carcinoma with areas of intermediata differentiation. A metatypical carcinoma? *Pathol Res Pract* 1991; 187: 978-985.
111. Loro L, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 125-138.
112. Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, surviving, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812.
113. Lucas R, Mc Michael T, Smith W, Armstrong B. Solar Ultraviolet Radiation: Global Burden of disease from Solar Ultraviolet Radiation. Environmental Burden of Disease Series No. 13. *Geneva WHO* 2006.
114. Majno G, Joris I. Cells, Tissues, and Disease. Oxford University Press, New York, 2004, pp: 735-968.
115. Mao JH, Wu D, Pérez-Losada J, Jiang T, Li Q, Neve RM, Gray JW, Cai WW, Balmain A. Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell* 2007; 11: 161-173.
116. Marghoob A, Kopf AW, Bart RS. Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *Am Acad Dermatol* 1993; 28: 22-31.
117. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.

-
118. McGibbon DH. Malignant epidermal tumours. *J Cutan Pathol* 1985; 12: 224-238.
119. Mendiola M, Barriuso J, Mariño-Enríquez A, Redondo A, Domínguez-Cáceres A, Hernández-Cortés G, Pérez-Fernández E, Sánchez-Navarro I, Vara JA, Suárez A, Espinosa E, González-Barón M, Palacios J, Hardisson D. Aurora kinases as prognostic biomarkers in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2009; 40: 631-638.
120. Mendiola M, Barriuso J, Redondo A, Mariño-Enríquez A, Madero R, Espinosa E, Vara JA, Sánchez-Navarro I, Hernández-Cortés G, Zamora P, Pérez-Fernández E, Miguel-Martín M, Suárez A, Palacios J, González-Barón M, Hardisson D. Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PLoS One*. 2008; 3: e4051.
121. Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetra-ploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *EMBO J* 2002; 21: 483-492.
122. Michalovitz D, Halevy O, Oren M. p53 mutations: gains or losses *J Cell Biochem* 1991; 45: 22-29.
123. Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: Incidence *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 774-782.
124. Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma. Parts II. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 161-175.
125. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000; 462: 247-253.
126. Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, Akiyama S. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995; 55: 1687-1690.
127. Moch H, Sauter G, Gasser TC, Buchholz N, Bubendorf L, Richter J, Jiang F, Dellas A, Mihatsch MJ. p53 protein expression but not mdm-2 protein expression is associated with rapid tumor cell proliferation and prognosis in renal cell carcinoma. *Urol Res* 1997; 25 (suppl.1): S25-30.
128. Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, Martín C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of surviving messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100-2104.
129. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sánchez C, Sarrió D, Cassia R, García-Rostán G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matías-Guiu X, Esteller M, Palacios J. Endometrial cancer. *Oncogene* 2002; 21: 7981-7990.
130. Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sarrió D, Sanchez C, Cassia R, Prat J, Herman JG, Esteller M, Matias-Guiu X, Palacios J. Abnormalities in E- and P-cadherin and catenin (β -, γ -catenin, and p120^{ctn}) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. *J Pathol* 2003; 199: 471-478.
131. Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Cassia R, Rodríguez-Perales S, Díaz-Uriarte R, Domínguez O, Hardisson D, Andújar M, Prat J, Matías-Guiu X, Cigudosa JC, Palacios J. Differential gene expression profile in endometrioid and non-endometrioid endometrial carcinoma: *SKT15* is frequently overexpressed and amplified in non-endometrioid carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 5697-5702.
132. Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T, Altieri DC. Survivin a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 2003; 82: 923-928.

133. Nam JH, Kim JH, Huh J, Nam JH, Mok JE. Correlation of lesion grade in cervical neoplasia with cellproliferation and apoptosis. *Int J Gynaecol Cancer* 1998; 8: 279-286.
134. Nappi O, Wick MR, Pettinato G, Ghiselli RW, Swanson PE. Pseudovascular adenoid squamous cell carcinoma of the skin. A neoplasm that may be mistaken for angiosarcoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 429-438.
135. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16: 113-120.
136. Neto PD, Alchorne M, Michalany N, Abreu M, Borra R. Reduced P53 Staining in Actinic Keratosis is Associated with Squamous Cell Carcinoma: A Preliminary Study. *Indian J Dermatol* 2013; 58: 325.
137. Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 21-32.
138. Oh CW, Penneys N. P27 and mib1 expression in actinic keratosis, Bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2004; 26: 22-26.
139. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favourable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; 163: 109-116.
140. Ota T, Suto S, Katayama H, Han ZB, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002; 62: 5168-5177.
141. Páez JG, Recio JA, Rouzaut A, Notario V. Identity between the PCPH proto-oncogene and de CD39L4 (ENTPD5) ectonucleoside triphosphate diphospho-hydrolase gene. *Int J Oncol* 2001; 19: 1249-1254.
142. Parenti A, Leo G, Porzionato A, Zaninotto G, Rosato A, Ninfo V. Expression of surviving, p53, and caspase 3 in Barrett's esophagus carcinogenesis. *Human Pathol* 2006; 37: 16-22.
143. Park HR, Min SK, Cho HD, Kim KH, Shin HS, Park YE. Expression profiles of p63, p53, survivin, and hTERT in skin tumors. *J Cutan Pathol* 2004;31: 544-549.
144. Parker AS, Kosari F, Lohse CM, Houston Thompson R, Kwon ED, Murphy L, RiehleDL, Blute ML, Leibovich BC, Vasmatazis G, Cheville JC. High expression levels of surviving protein independently predict a poor outcome for patients who undergo surgery for clear cell carcinoma. *Cancer* 2006; 107: 37-45.
145. Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM Sheinin Y, Kuntz SM, Eckel-Passow JE, Blute ML, Kwon ED. Development and evaluation of BioScore. A biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2009; 115: 2092-2103.
146. Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2008; 68: 4541-4550.
147. Perkins W, Campbell I, Leigh I, Mackie R. Keratin expression in normal skin and epidermal neoplasms demonstrated by a panel of monoclonal antibodies. *J Cutan Pathol* 1984; 19: 449-452.

148. Pritchard B, Youngberg G. Atypical mitotic figures in basal cell carcinoma. A review of 208 cases. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 549-552.
149. Qi G, Kudo Y, Ando T, Tsunematsu T, Shimizu N, Siriwardena SB, Yoshida M, Keikhaee MR, Ogawa I, Takata T. Nuclear survivin expression is correlated with malignant behavior of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol* 2010; 46: 263-270.
150. Regadera J, Blázquez MJ, González-Peramato P, Nistal M, Miller JC, Tirado OM, Notario V. PCPH expression is an early event in the development of testicular germ cell tumors. *Int J Oncol* 2006; 28: 595-604.
151. Regadera J, Martínez-García F, Paniagua R, Nistal M. Androgen insensitivity syndrome. An immunohistochemical, ultrastructural, and morphometric study. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 225-234.
152. Requena L, Sánchez M, Requena I, Alegría V, Sánchez Yus E. Clear cell squamous cell carcinoma. A histologic, immunohistologic, and ultrastructural study. *J Dermatol Surg Oncol* 1991; 17: 656-660.
153. Rigel DS, Stein Gold LF. The importance of early diagnosis and treatment of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68 (Suppl 1): S20-27.
154. Ritchie SA, Patel MJ, Miller SJ. Therapeutic options to decrease actinic keratosis and squamous cell carcinoma incidence and progression in solid organ transplant recipients: a practical approach. *Dermatol Surg* 2012; 38: 1604-1621.
155. Roa JC. Marcadores moleculares: proliferación celular e inestabilidad microsatelital. *Gastr Latinoam* 2003; 14: 195-199.
156. Rosai J. Basal cell carcinoma with follicular differentiation (Letter to the Editor II). *Am J Dermatopathol* 1989; 11: 479-480.
157. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Elsevier Inc. Edinburgh, 2011, pp: 128-236.
158. Rubin R, Strayer DS. Patología. Fundamentos Clínicopatológicos en Medicina. Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, 2012, pp: 157-212 y 1111-1168.
159. Saglam O, Salama M, Meier F, Chaffins M, Ma C, Ormsby A, Lee M. Immunohistochemical staining of palisading basal cells in Bowen's disease and basal involvement in actinic keratosis: contrasting staining patterns suggest different cells of origin. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 123-126.
160. Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. Structural, functional and therapeutic biology of surviving. *Cancer Lett* 2006; 244: 164-161.
161. Said JW, Sassoon AF, Shintaku IP, Banks-Schlegel S. Involucrin in squamous and basal cell carcinomas of the skin. An immunohistochemical study. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 449-452.
162. Sarrió D, Moreno-Bueno G, Sánchez-Estévez C, Banón-Rodríguez I, Hernández-Cortés G, Hardisson D, Palacios J. Expression of cadherins and catenins correlates with distinct histologic types of ovarian carcinomas. *Hum Pathol* 2006; 37: 1042-1049.
163. Schmitt JV, Miot HA. Actinic keratosis: a clinical and epidemiological revision. *An Bras Dermatol* 2012; 87: 425-434.
164. Sejima T, Miyagawa I. Expression of Bcl-2, p53 oncoprotein, and proliferating cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 1999; 35: 242-248.

-
165. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Horvath S, Figlin R, Beldegrun A, Pantuck AJ. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *J Urol* 2005; 173: 725-728.
 166. Smit P, Plomp E, Neumann HA, Thio HB. The influence of the location of the lesion on the absolute risk of the development of skin cancer in a patient with actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; 27: 667-671.
 167. Smith KJ, Skelton HG III, Morgan AM, Barrett TL, Lupton GP. Spindle cell neoplasms coexpressing cytokeratin and vimentin (metaplastic squamous cell carcinoma). *J Cutan Pathol* 1992; 19: 286-293.
 168. Smoller BR, Krueger J, McNutt NS, Hsu A. "Activated" keratinocyte phenotype is unifying feature in conditions which predispose to squamous cell carcinoma of the skin. *Mod Pathol* 1990; 3: 171-175.
 169. Snow SN, Sahl W, Lo JS, Mohs FE, Warner T, Dekkinga JA, Feyzi J. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer* 1994; 73: 328-335.
 170. Soares AR, Neves MG, Tomé AC, Iglesias-de la Cruz MC, Zamarrón A, Carrasco E, González S, Cavaleiro JA, Torres T, Galdi DM, Juarranz A. Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 940-951.
 171. Stenquist B, Wennberg AM, Gisslen H, Larko O. Treatment of aggressive basal cell carcinoma with intralesional interferon: evaluation of efficacy by Mohs surgery *J Am Acad Dermatol* 1992. 27: 65-72.
 172. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule surviving and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; 341: 452-453.
 173. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002;184:105-16.
 174. Talghini S, Halimi M, Baybordi H. Expression of P27, Ki67 and P53 in squamous cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen disease. *Pak J Biol Sci* 2009; 12: 929-933.
 175. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of surviving and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 127-134.
 176. Tsai MY, Wiese C, Cao K, Martin O, Donovan P, Ruderman J, Prigent C, Zheng Y. A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol* 2003;5:242-248.
 177. Twu NF, Yuan CC, Yen MS, Lai CR, Chao KC, Wang PH, Wu HH, Chen YJ. Expression of Aurora kinase A and B in normal and malignant cervical tissue: high Aurora A kinase expression in squamous cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 142: 57-63.
 178. Uchida T, Gao JP, Wang C, Satoh T, Itoh I, Muramoto M, Hyodo T, Irie A, Akahoshi T, Jiang SX, Kameya T, Baba S. Antitumor effect of bcl-2 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human renal-cell carcinoma cells in vitro and in mice. *Mol Urol* 2001; 5: 71-78.
 179. Vasavada SP, Novic AC, Williams BR. P53, bcl2, and BAX expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998; 51: 1057-1061.

180. Velasco JA, Feijó E, Avila MA, Notario V. Secretion of neu differentiation factor - like polypeptides by *cph*-transformed fibroblasts: Cloning and characterization of syrian hamster neureglulin cDNAs. *Mol. Carcinog* 1998; 21: 156-163.
181. Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodríguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of Aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 2905-2913.
182. Wakita H, Shirahama S, Furukawa F. Distinct P-cadherin expression in cultured normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *Micros Res Rec* 1998; 43: 218-223.
183. Wallace ML, Smoller BR. Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 163-185.
184. Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* 2000; 19: 4906-4916.
185. Wang C-Y, Brodland DG, Su WPD. Skin cancers associated with acquired inuodeficiency syndrome. *Mayo Clin Proc* 1995; 70: 766-772.
186. Warner SL, Bearss DJ, Han H, Von Hoff DD. Targeting Aurora-2 Kinase in Cancer. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 589-595.
187. Webster TF, Hoffman K, Weinberg J, Vieira V, Aschengrau A. Community- and individual-level socioeconomic status and breast cancer risk: multilevel modeling on Cape Cod, Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 1125-1129.
188. Weikert S, Schrader M, Christoph F, Schulze W, Krause H, Müller M, Miller K. Quantification of survivin mRNA in testes of infertile patients and in testicular germ cell tumours: high levels of expression associated with normal spermatogenesis. *Int J Androl* 2005; 28: 224-229.
189. Weikert S, Schrader M, Krause H, Schulze W, Müller M, Miller K. The inhibitor of apoptosis (IAP) survivin is expressed in human testicular germ cell tumors and normal testes. *Cancer Lett* 2005; 223: 331-337.
190. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49: 3713-3721.
191. Weinstein MC, Brodell RT, Bordeaux J, Honda K. The art and science of surgical margins for the dermatopathologist. *Am J Dermatopathol* 2012; 34: 737-745.
192. Weiss L. Cell adhesion molecules: A critical examination of their role in metastasis. *Invasion Metastasis* 1994-95; 16: 193-202.
193. Wen D, Peles E, Cupples R. Neu differentiation factor: A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* 1992; 69: 559-572.
194. Wiegell SR, Wulf HC, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Gerritsen MJ, Gilaberte Y, Calzavara-Pinton P, Morton CA, Sidoroff A, Braathen LR. Daylight photodynamic therapy for actinic keratosis: an international consensus: International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26: 673-679.
195. Williams GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 1993; 74: 777-779.
196. Wu Y, Wang G, Wei J, Wen X. Survivin protein expression positively correlated with proliferative activity of cancer cells in bladder cancer. *Indian J Med Sci* 2005; 59: 235-42.

-
197. Xu D, Yuan R, Gu H, Liu T, Tu Y, Yang Z, He L. The effect of ultraviolet radiation on the transforming growth factor beta 1/Smads pathway and p53 in actinic keratosis and normal skin. *Arch Dermatol Res* 2013; 305: 777-786.
 198. Yoshida H, Ishiko O, Sumi T, Matsumoto Y, Ogita S. Survivin, Bcl-2 and matrix metalloproteinase-2 enhance progresión of clear cell and serous-type ovarian carcinomas. *In J Oncol* 2001; 19: 537-42.
 199. Yuspa SH, Dlugosz A, Cheg C. Role of oncogenes and tumor suppressor genes in multistage carcinogénesis. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 90S-95S.
 200. Zhang W, Wang J, Liu SJ, Hua W, Xin XY. Correlation between Aurora-A expression and the prognosis of cervical carcinoma patients. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2009; 88: 521-7.
 201. Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 1998; 20: 189-193.
 202. Ziegler A, Honason AS, Leffell EDJ. Suburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; 372: 773-776.
 203. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology* 2004; 63: 651-655.